

**VERSUCHE ZUR IMMUNISIERUNG GEGEN
DIE TRYPANOSOMA EVANSIINFEKTION
DER MAUS (STAMM MANILA)**

Christine Stolte

München 1982

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr.H.K. Dennig

VERSUCHE ZUR IMMUNISIERUNG GEGEN DIE TRYPANOSOMA EVANSI-
INFEKTION (STAMM MANILA) DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Christine Stolte
aus
Augsburg

München 1982



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. H.K. Dennig

1. Korreferent: Prof. Dr. M. Rüsse

2. Korreferent: Prof. Dr. M. Merckenschlager

Tag der Promotion: 30. Juli 1982

I. Einführung	1
II. Systematik der Tierwelt	2
1. Systematik der Tierwelt	2
2. Systematik der Tierwelt	2
III. Tierwelt und Mensch	3
1. Tierwelt und Mensch	3
2. Tierwelt und Mensch	3
IV. Tierwelt und Mensch	4
1. Tierwelt und Mensch	4
2. Tierwelt und Mensch	4
V. Tierwelt und Mensch	5
1. Tierwelt und Mensch	5
2. Tierwelt und Mensch	5
VI. Tierwelt und Mensch	6
1. Tierwelt und Mensch	6
2. Tierwelt und Mensch	6
VII. Tierwelt und Mensch	7
1. Tierwelt und Mensch	7
2. Tierwelt und Mensch	7
VIII. Tierwelt und Mensch	8
1. Tierwelt und Mensch	8
2. Tierwelt und Mensch	8
IX. Tierwelt und Mensch	9
1. Tierwelt und Mensch	9
2. Tierwelt und Mensch	9
X. Tierwelt und Mensch	10
1. Tierwelt und Mensch	10
2. Tierwelt und Mensch	10
XI. Tierwelt und Mensch	11
1. Tierwelt und Mensch	11
2. Tierwelt und Mensch	11
XII. Tierwelt und Mensch	12
1. Tierwelt und Mensch	12
2. Tierwelt und Mensch	12
XIII. Tierwelt und Mensch	13
1. Tierwelt und Mensch	13
2. Tierwelt und Mensch	13
XIV. Tierwelt und Mensch	14
1. Tierwelt und Mensch	14
2. Tierwelt und Mensch	14
XV. Tierwelt und Mensch	15
1. Tierwelt und Mensch	15
2. Tierwelt und Mensch	15
XVI. Tierwelt und Mensch	16
1. Tierwelt und Mensch	16
2. Tierwelt und Mensch	16
XVII. Tierwelt und Mensch	17
1. Tierwelt und Mensch	17
2. Tierwelt und Mensch	17
XVIII. Tierwelt und Mensch	18
1. Tierwelt und Mensch	18
2. Tierwelt und Mensch	18
XIX. Tierwelt und Mensch	19
1. Tierwelt und Mensch	19
2. Tierwelt und Mensch	19
XX. Tierwelt und Mensch	20
1. Tierwelt und Mensch	20
2. Tierwelt und Mensch	20

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Untersuchungen zur Immunisierung gegen Trypanosoma evansi und andere Trypanosomen- arten (anhand der Literatur)	2
III. Eigene Untersuchungen	10
A. Material und Methoden	10
B. Ergebnisse	16
1. Prüfung der Toxizität von β -Propiolacton (BPL) an Mäusen	16
2. Überlebenszeit von T. evansi in unter- schiedlichen β -Propiolacton-Konzentrationen	17
3. Morphologische Veränderungen von T. evansi nach Einwirkung von β -Propiolacton	20
4. Einfluß von β -Propiolacton auf die Infektiosität von T. evansi	21
5. Untersuchungen zur Immunisierung mit T. evansi	24
a. Immunisierung mit lebenden Parasiten	24
b. Immunisierung mit abgetöteten Parasiten	27
c. Immunisierung mit lyophilisierten Parasiten	33
d. Dauer der Immunität	35
IV. Besprechung der Ergebnisse	37
V. Zusammenfassung	45
Summary	
VI. Literaturverzeichnis	47
Lebenslauf	

I. Einleitung

Trypanosoma evansi ist der Erreger der "Surra". Die Hauptverbreitungsgebiete erstrecken sich über große Teile Asiens, Afrikas, Süd- und Mittelamerikas. In diesen Gebieten verursacht die Krankheit, insbesondere bei Pferden, Rindern und Kamelen, wirtschaftliche Verluste. Auch andere Haustierarten - Esel, Büffel, Schweine, Ziegen, Hunde -, in begrenztem Umfang Wildtiere sowie Labortiere sind für den Erreger empfänglich.

Hauptsymptome der "Surra" sind intermittierendes Fieber, petechiale Schleimhautblutungen, Ödeme an Kopf, Brust und im Genitalbereich sowie progressive Anämie, Inappetenz, Schwäche und Kachexie. Je nach Tierart kann die Krankheit akut, chronisch oder latent verlaufen, häufig endet sie tödlich.

Als Überträger von *T. evansi* kommen blutsaugende Insekten, insbesondere Tabaniden, in Frage. Dabei findet im Gegensatz zur Mehrzahl der übrigen Trypanosomiasen mit zyklischer, eine mechanische Übertragung statt.

Zur Bekämpfung der akuten und chronischen *T. evansi*-Infektion werden eine Reihe von trypanoziden Verbindungen, wie Diminazene, Quinapyramine und Isometamidium angewendet.

Eine prophylaktische Behandlung, insbesondere in Form der Vakzinierung, fehlt unter Feldbedingungen, entsprechende Vakzinen stehen bislang nicht zur Verfügung.

Ziel der folgenden Arbeit war es, Versuche zur Immunisierung gegen die *T. evansi*-Infektion am Modell der Maus durchzuführen. Hierbei sollte die Antigen-Herstellung unter Verwendung von β -Propiolacton erfolgen und die Immunisierung mit lebenden, abgetöteten und lyophilisierten Parasiten vorgenommen werden.

II. Untersuchungen zur Immunisierung gegen Trypanosoma evansi und andere Trypanosomenarten (anhand der Literatur)

Untersuchungen zur Immunisierung in Verbindung mit der Behandlung der akuten Trypanosomiasis-Infektion

EHRLICH und SHIGA (1904) führten an Mäusen Versuche zur Immunisierung mit *T. equinum*, einer mit *T. evansi* verwandten Spezies, durch. Sie infizierten experimentell die Versuchstiere und behandelten sie mit Trypanrot, um die Parasiten abzutöten. Die vermutete Immunität wiesen sie 1-7 Tage nach der Therapie mit Hilfe von Belastungsinfektionen nach. Sie beobachteten zwar verlängerte Überlebenszeiten von 11-53 Tagen, trotzdem lag die Mortalitätsrate der Versuchstiere bei 100%.

TERRY (1911) führte Immunisierungsversuche durch, wobei er als Antigen *T. evansi* (Stamm Mauritius, Stamm Indien, Stamm Nhatrang) sowie *T. equinum*, *T. equiperdum* und *T. brucei* verwendete. Ähnlich wie EHRLICH und SHIGA (1904) erzeugte er einen Immunschutz, indem er Mäuse experimentell infizierte und anschließend mit einer Reihe von trypanoziden Mitteln, wie Arsenophenylglyzin, Dichlorbenzidine und Trypanrot behandelte. Nach verschiedenen Intervallen belastete er die Tiere und stellte fest, daß sie durchschnittlich bis zum 8. Tag p. th. mit homologen Erregern infiziert werden konnten, ohne zu erkranken.

Bei Untersuchungen zur Kreuzimmunität beobachtete TERRY, daß sich nach der Infektion mit verschiedenen Trypanosomen-Spezies keine Kreuzimmunität ausbildete. Außerdem zeigte sich, daß auch bei Verwendung verschiedener Trypanosomen-Stämme (Stamm Indien, Stamm Mauritius) eine Kreuzimmunität fehlte.

BEVAN (1928, 1936) beobachtete, daß Rinder, bei denen sich nach der chemotherapeutischen Behandlung der *T. congolense*-Infektion keine parasitäre Heilung einstellte, trotz Reinfektion mit demselben Erreger, klinisch gesund blieben. Diesen Zustand bezeichnete er als "state of tolerance". Versuche, einen solchen Toleranzzustand unter Feldbedingungen herbeizuführen durch experimentelle Infektion der Rinder mit anschließender Be-

handlung, scheiterten. Die Immunität brach häufig nach Infektion mit heterologen Trypanosomen sowie mit Viren und Bakterien zusammen, so daß die Rinder an akuter Trypanosomiasis erkrankten.

Nach demselben Schema wie EHRLICH und SHIGA (1904) führten LOURIE und O'CONNOR (1936) sowie FULTON und LOURIE (1945) Immunisierungsversuche mit verschiedenen Trypanosomenarten durch. Es zeigte sich, daß infizierte Mäuse, die mit trypanoziden Substanzen behandelt waren, nach einer Belastungsinfektion eine Immunität gegen die gleiche Erregerspezies aufgebaut hatten. Bei *T. congolense* war sie bis zu 20, bei *T. rhodesiense* bis zu 26 und bei *T. brucei* bis zu 32 Wochen nachweisbar.

Untersuchungen zur Immunisierung mit lebenden, vermehrungsunfähigen bzw. virulenzgeschwächten Erregern

DUXBURY und SADUN (1969) immunisierten Mäuse mit lebenden, gamma-bestrahlten Trypanosomen (*T. rhodesiense*). Die Parasiten verloren durch die Bestrahlung ihre Vermehrungsfähigkeit und führten nicht mehr zur Infektion. Bei zwei- oder dreimaliger Verabreichung der Antigene (2×10^6 Parasiten/Maus) trat bei den Versuchstieren ein 100%iger Schutz gegenüber der Belastungsinfektion mit 10^3 homologen Erregern auf, während bei einmaliger Verabreichung 70-90% der Mäuse geschützt waren. Auch bei Affen führte die wiederholte Verabreichung von bestrahlten *T. rhodesiense* (6fach) zu einem hochgradigen Schutz gegenüber Reinfektion (DUXBURY et al., 1972).

Ähnliche Versuche führten DUXBURY et al. (1972) mit *T. congolense* durch. Allerdings waren hier die Ergebnisse unterschiedlich. Während bei Mäusen 100% der Tiere, die sechsmal mit jeweils 2×10^7 bestrahlten Parasiten immunisiert waren und mit 10^3 Trypanosomen/Tier belastet wurden, geschützt blieben, versagte die Immunisierung bei Hunden und Rindern. Trotz hoher Immunisierungsdosen (fünfmal verabreichte Inokula zu je $1,15 \times 10^{10}$ Parasiten/Tier bei Hunden und siebenmal verabreichte Inokula zu je 1×10^9 Parasiten/Tier bei Rindern) entwickelte sich die akute Infektion bei einer parasitären Belastungsinfektion von $8,5 \times 10^4$ bzw. 5×10^4 Trypanosomen/Tier.

JAMES et al. (1973) bewirkten eine Virulenzabschwächung von *T. brucei* durch Einwirkung von Gammastrahlen. Drei- oder mehrmalige Verabreichung von je 10^6 bestrahlten Trypanosomen führte allerdings bei Ratten zu keinem Schutz gegenüber Reinfektion mit 10^6 homologen Parasiten/Tier. Es wurde lediglich eine verlängerte Überlebenszeit der Versuchstiere beobachtet. Bei Reduzierung der Infektionsdosis dagegen auf 10^5 Parasiten/Tier zeigte sich, daß 15% der Tiere völlig geschützt waren.

WELLDE et al. (1973) führten ebenfalls Immunisierungsversuche bei Rindern mit gamma-bestrahlten *T. rhodesiense* durch. Das Inokulum für die Immunisierung betrug 10^9 Parasiten/Tier und wurde dreimal im Abstand von einer Woche verabreicht. Die Zahl der homologen Erreger zur Belastungsinfektion betrug 10^5 Parasiten/Tier. Dabei wurde eine Immunität nachgewiesen, die durchschnittlich 8 Monate, in einzelnen Fällen 14 Monate, dauerte.

JAMES (1976) führte Immunisierungsversuche bei Mäusen und Ratten mit *T. brucei* und *T. congolense* durch, die trypanoziden Substanzen wie Samorin^R (Isometamidium chlorid) und Berenil^R (4,4'-Diamidino-diazoaminobenzoldiaceturat) ausgesetzt waren. Die Einwirkungszeiten und Konzentrationen der Mittel wurden dabei so bemessen, daß die Trypanosomen zwar ihre Infektiosität verloren, aber nicht abgetötet wurden. Nach i.v. Verabreichung der lebenden Parasiten in hoher Dosierung ($3,2 \times 10^6$ Parasiten/Maus) waren die Erreger bis zu 24 Stunden im Blut der Versuchstiere nachweisbar. Dabei wurde nach 11 und 42 Tagen eine Immunität festgestellt, die die Versuchstiere während einer Beobachtungszeit von 20 Tagen gegen eine Belastungsinfektion mit bis zu 10^5 Parasiten schützte. Die relativ hohe Immunität führte JAMES darauf zurück, daß die Trypanosomen nach ihrer Übertragung noch Antigene ausscheiden konnten.

In den Versuchen zeigte sich weiterhin, daß Mäuse nach zwei- oder dreimaliger Immunisierung (jeweils $3,2 \times 10^6$ Parasiten/Maus) gegen eine Belastungsinfektion mit 10^4 und 10^5 Trypanosomen schlechter geschützt waren als nach einer einmaligen Immunisierung.

HUNGERER et al. (1976) ließen eine Reihe von Substanzen auf Kulturformen von *T. cruzi* einwirken, die abhängig von Einwirkungszeit und Konzentration die Vermehrungsfähigkeit der Trypanosomen verhinderten. Mit diesen lebender

Parasiten in der Dosierung von 5×10^7 Trypanosomen/Maus führten sie Immunisierungsversuche durch. Dabei stellten sie fest, daß einige dieser Mittel nicht nur die Teilungsfähigkeit beeinflussten, sondern offensichtlich auch die immunisierende Wirkung unterdrückten, wie spätere Belastungsversuche ergaben. Bei Verwendung von Ethidiumbromid, Dimidium und Samorin^R dagegen blieb die immunisierende Wirkung vollständig erhalten. Die beste Immunisierung erzielten sie mit Trypanosomen, die Ethidiumbromid ausgesetzt waren. Hierbei überlebten alle Mäuse eine nach 18 Tagen durchgeführte Belastungsinfektion mit 5×10^5 Parasiten/Maus symptomfrei.

HERTKORN (1981) führe Immunisierungsversuche mit virulenzgeschwächten *T. evansi* verschiedener Stämme durch. Zur Virulenzabschwächung wurden die Parasiten einer Berenil^R-Lösung ausgesetzt. Es zeigte sich hierbei, daß eine Immunisierung mit 1500 lebenden Trypanosomen/Maus eines sehr virulenten *T. evansi*-Stammes (Bali) gegen eine 34, 42 und 66 Tage später durchgeführte Belastungsinfektion mit dem homologen virulenten Ausgangsstamm (500 bzw. 5000 Parasiten/Maus) eine gute Immunität bewirkte. Eine Kreuzimmunität gegenüber einem anderen *T. evansi*-Stamm (Kairo) fehlte dagegen. Die Beobachtungszeiten betrugen 90 Tage p.i..

Untersuchungen zur Immunisierung mit abgetöteten Trypanosomen oder mit Stoffwechselprodukten der Erreger

SOLTYS und SMITH (1963) verwendeten zur zweimaligen Immunisierung von Ratten formalinisierte Trypanosomen (*T. brucei*). Bei der 45 Tage später durchgeführten Belastungsinfektion überlebten 79% der Versuchstiere.

In späteren Versuchen prüfte SOLTYS (1965) verschiedene chemische Substanzen auf ihre Fähigkeit, *T. brucei* abzutöten, ohne die immunologischen Eigenschaften der Parasiten zu zerstören. Dabei erwies sich im Vergleich mit Formalin und Phenol, ebenso wie LOGRIPPO und HARTMANN (1955) dies schon für die Virusinaktivierung nachgewiesen haben, β -Propiolacton als geeignetste Substanz. Nachdem die Trypanosomen 10-15 Min. einer 0,1%igen β -Propiolacton-Konzentration bei 4°C ausgesetzt waren, zeigten sie keine Bewegungsaktivität mehr.

Eine einmalige Dosierung von 2-3 Millionen Trypanosomen/Maus genügte, um Mäuse, die drei Wochen später mit 200 Parasiten desselben Stammes belastet wurden, zu schützen.

SOLTYS (1967) verwendete zur Immunisierung von Mäusen Trypanosomen (*T. brucei*), die mit β -Propiolacton, Formalin, Phenol, destilliertem Wasser und hohen Temperaturen (56°C) abgetötet wurden. Zur Abtötung der Trypanosomen mit β -Propiolacton wurden die Parasiten einer 0,1%igen Konzentration bei 4°C ausgesetzt. Nach 10-15 Min. war keine Bewegungsaktivität mehr feststellbar.

Die Tiere erhielten zweimal im Abstand von 3 Wochen eine Immunisierungsdosis mit je 2-3 Millionen Trypanosomen. Nach 3 bzw. 6 Wochen wurde eine Belastungsinfektion mit 20 Parasiten desselben Stammes durchgeführt. Die besten Ergebnisse beobachtete er nach der Immunisierung mit Trypanosomen, die mit β -Propiolacton abgetötet waren. 100% der Tiere, die nach 3 Wochen bzw. 80% der Mäuse, die nach 6 Wochen belastet wurden, überlebten symptomfrei und ohne nachweisbare Parasitämie. Dagegen verendeten 20-100% der Mäuse, die mit Formalin, Phenol, destilliertem Wasser und hohen Temperaturen behandeltes Antigen erhielten.

NEAL und JOHNSON (1977) führten Immunisierungsversuche an Mäusen mit Trypanosomen (*T. cruzi*) durch, die u.a. mit β -Propiolacton, Formalin und durch Gefriertrocknung abgetötet wurden. Für die Untersuchungen wurde formaliniertes und β -Propiolacton-inaktiviertes Antigen sowohl mit als auch ohne Adjuvans (Saponin SPL) verabreicht. Gefriergetrocknetes Antigen dagegen kam stets mit Adjuvans zur Anwendung. Zur Abtötung der Trypanosomen mit β -Propiolacton verwendeten sie eine 1%ige Konzentration. Das Gemisch wurde bei 37°C inkubiert. Nach 10 Min. war keine Bewegungsaktivität der Trypanosomen mehr feststellbar.

Die Versuchstiere wurden zweimal im Abstand von 2 Wochen mit 10^8 Trypanosomen immunisiert. Nach einer zwei Wochen später durchgeführten Belastungsinfektion mit 10^5 homologen Parasiten waren 40% bzw. 100% der Versuchstiere geschützt, denen β -Propiolacton-inaktiviertes Antigen ohne bzw. mit Adjuvans verabreicht wurde. 50% bzw. 90% der Mäuse, die formalinisiertes Antigen ohne bzw. mit Adjuvans erhalten hatten, überlebten symptomfrei. Sehr gute Ergebnisse wurden ebenfalls mit gefriergetrocknetem Antigen erzielt. Lyophilisierte Trypanosomen, die 4 Monate bei -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$, $+24^{\circ}\text{C}$ und $+37^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurden, schützten 70-90% der Mäuse gegen eine Belastungsinfektion mit derselben Anzahl von Parasiten.

GILL (1965) führte Immunisierungsversuche mit *T. evansi* (Stamm Madras, Stamm Wellcome NS) durch. Er untersuchte an Mäusen die immunisierende Wirksamkeit verschiedener Antigene (formalinisiertes, aufgetautes, gefriergetrocknetes und zellfreies Antigen). In den Versuchen wurden die Antigene teilweise mit Adjuvantien (Saponin SPL, Arquad 2 HT) verabreicht.

Die Versuchstiere wurden zweimal im Abstand von 14 Tagen mit je 10^9 Trypanosomen desselben Stammes immunisiert und nach zwei Wochen mit 10^3 homologen Parasiten belastet. Die besten Ergebnisse beobachtete er nach der Immunisierung mit 0,1% formalinisiertem Antigen, 0,1% formalinisiertem Antigen plus Adjuvans und mit aufgetautem Antigen. Während einer Beobachtungszeit von 21 Tagen konnte bei keinem Versuchstier eine *T. evansi*-Infektion nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von gefriergetrocknetem und zellfreiem Antigen waren die Erfolge weniger gut. Nach der Belastungsinfektion entwickelten 60% bzw. 30% der Mäuse eine tödlich verlaufende Infektion.

DUXBURY et al. (1974) immunisierten Mäuse erfolgreich gegen die afrikanische Trypanosomiasis (*T. rhodesiense*) mit unzerstörten lyophilisierten, zwei unterschiedlichen Fraktionen (P-Fraktion = particulate fraction $\hat{=}$ Sediment; S-Fraktion = soluble fraction $\hat{=}$ Überstand) zerstörter lyophilisierter und mit Exkretions- und Sekretionsantigenen lebender Trypanosomen.

Die Tiere wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen mit 0,1 ml einer 10 mg/ml Trypanosomen-Kochsalz-Suspension immunisiert. Nach der zwei Wochen später durchgeführten Belastungsinfektion mit einem homologen Stamm (10^3 Parasiten/Tier) waren 100% der Versuchstiere geschützt, denen Exkretions- und Sekretionsantigene und 95% der Mäuse, denen unzerstörte, gefriergetrocknete Trypanosomen verabreicht wurden. Von den Mäusen, die zerstörte lyophilisierte Parasiten erhielten, überlebten nur 48% (S-Fraktion) und 70% (P-Fraktion).

RYU (1975) führte Immunisierungsversuche an jungen und ausgewachsenen Mäusen mit Trypanosomen (*T. evansi*) durch, die durch verschiedene chemische Substanzen abgetötet waren. Sehr gute Ergebnisse erzielte er bei jungen Mäu-

sen mit Trypanosomen, die in PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung), PBS plus 0,5% Karbolzusatz und in Lugol'scher Lösung inaktiviert waren. Die einmalige Immunisierung (0,1 ml parasitäres Vollblut in entsprechender Substanz 1:100) schützten 60-80%, die mehrmalige Verabreichung (fünfmal) des Antigens über 80% der jungen Mäuse gegen eine zwei Wochen später durchgeführte Belastungsinfektion mit homologen Erregern (0,1 ml parasitäres Vollblut verdünnt 1:10.000). Bei Parallelversuchen mit ausgewachsenen Mäusen überlebte kein Versuchstier die Belastungsinfektion.

Ungünstigere Ergebnisse erzielte RYU bei der Immunisierung mit Parasiten, die u.a. mit destilliertem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung und Formalin abgetötet wurden. In diesen Versuchen überlebten nur 20-50% der Mäuse. In einer weiteren Arbeit (RYU und SHAEY, 1980) verglichen sie die Wirksamkeit von gebundenen Trypanosomen-Antigenen (*T. evansi*) in ihren immunisierenden Eigenschaften. Hierbei verwendeten sie Trypanosomen Antigene, die an natürlichem Zeolit bzw. an künstlich hergestelltem Zeolit angelagert waren. Dazu wurden die Mäuse ein- oder zweimal im Abstand von einer Woche mit 5×10^5 Parasiten/Tier immunisiert und in der zweiten und dritten Woche mit 10^2 Trypanosomen des homologen Stammes belastet. Die Versuche ergaben, daß an natürliches Zeolit gebundenes Antigen eine deutlich bessere immunisierende Wirkung aufwies (70-90% Überlebensrate) als Antigen, das an künstlichem Zeolit angelagert war (20-40% Überlebensrate).

Weitere Versuche zur Immunisierung führten AWAD et al. (1980) mit lyophilisierten *T. evansi*, formalinisiertem parasitärem Vollblut und löslichen Plasmaantigenen durch. Die Immunität der Tiere prüften sie nach 2 Wochen durch eine Belastungsinfektion mit Parasiten des homologen Stammes. Die Mortalitätsrate der mit löslichem Plasmaantigen immunisierten Mäuse betrug 13%. Bei den übrigen Mäusen lag sie bei 100%.

In den Untersuchungen von HERTKORN (1981) wurden ebenfalls Versuche zur Immunisierung mit abgetöteten *T. evansi* (Stamm Bali) durchgeführt. Zur Abtötung der Parasiten wurden die Trypanosomen 90 Min. einer 0,1%igen β -Propiolacton-BSG-Lösung (BSG = Bicine buffered saline glucose) bei -4°C ausgesetzt. Für die Versuche erhielten die Mäuse eine einmalige Immunisierungs-

dosis von 750.000 Parasiten/Maus. In diesen Versuchen zeigte sich eine hohe Immunität, die 100% der Versuchstiere gegen eine 35 Tage später durchgeführte Belastungsinfektion mit dem homologen Ausgangsstamm (500 Parasiten/Maus) schützte.

Anhand einer Literaturübersicht berichtete SOLTYS (1973) über die bisherigen Versuche zur Immunisierung gegen die afrikanische Trypanosomiasis, sei es durch Infektion mit lebenden Erregern, durch chemotherapeutische Behandlung der Tiere nach der Infektion oder durch Inokulation abgetöteter Erreger bzw. ihrer Stoffwechselprodukte.

In Übersichtsreferaten befaßten sich Autoren, wie CLARKSON (1976), TERRY (1976), MURRAY und URQUHART (1977), HOLMES (1980) und MAHMOUD und GRAY (1980) u.a. mit der Problematik der Immunisierung und Immunprophylaxe bei der Trypanosomiasis.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Infektionsmaterial

Der verwendete *T. evansi*-Stamm wurde 1980 auf den Philippinen aus einem Pferd isoliert. Seither wird er am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie auf Mäusen passagiert. Es handelt sich um einen hochvirulenten Stamm gegenüber Mäusen.

Versuchstiere

Es wurden männliche und weibliche Mäuse aus institutseigener Zucht verwendet. Bei Versuchsbeginn betrug das Alter der Tiere 4-6 Wochen, ihr Gewicht 15-25 g. Die Mäuse wurden unter gleichbleibenden Bedingungen bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-50% gehalten. Ihre Haltung erfolgte in Gruppen von maximal 20 Tieren in Makrolonkäfigen. Als Futter erhielten die Mäuse "Altromin Mäusediät" (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte nach der Methode von NÜLLER (1955) aus dem retro-orbitalen Venenplexus. Zur Durchführung der Untersuchungsmethode nach WOO (1969) wurde den Tieren durchschnittlich 0,07 ml Blut/Maus entnommen. Zur Herstellung des Antigens erfolgte eine vollständige Entblutung der Mäuse in Äthernarkose.

Inokula

Zur Erzeugung einer hohen Parasitämie (Antigen-Herstellung) erhielten die Mäuse 0,3 ml (890.000 Parasiten/Maus) einer Parasitensuspension, bestehend aus 0,14 ml parasitärem Vollblut und 6 ml physiologischer Kochsalzlösung.

Für die Immunisierungsversuche und in den Versuchen zur Prüfung der Infektiosität der mit β -Propiolacton (BPL) behandelten Parasiten, wurden isolierte lebende und abgetötete Trypanosomen in einer β PL-PSG-Lösung (PSG = Phosphate buffered saline glucose, pH 8,0) in der Dosierung von 0,2 bzw.

0,5 ml/Maus übertragen. Zur Verabreichung von lyophilisierten Parasiten wurde das Antigen vorher mit Aqua pro injectione (Ampuwa^R, Fa. Fresenius, Bad Homburg) versetzt. Für Kontrolluntersuchungen erhielten die Mäuse das Inokulum in gleicher Dosierung ohne BPL. Die Übertragung der Inokula erfolgte stets i.p.. Die Immunisierung wurde mit 1, 2, 4 und 8%igen Suspensionen (Parasiten-BPL-PSG bzw. Parasiten-BPL-Aqua pro injectione) durchgeführt. Die Ermittlung des Parasitengehaltes der Inokula erfolgte durch Auszählung in der Thoma-Kammer. Für die verschiedenen Inokula ergaben sich dabei folgende Werte:

0,5 ml einer 1%igen Suspension = $0,25 \times 10^8$ Trypanosomen

0,5 ml einer 2%igen Suspension = $0,5 \times 10^8$ Trypanosomen

0,5 ml einer 4%igen Suspension = $1,2 \times 10^8$ Trypanosomen

0,5 ml einer 8%igen Suspension = $2,4 \times 10^8$ Trypanosomen

Nachweis der Trypanosomen

Der Nachweis der Parasiten wurde nach der Methode von WOO (1969) durchgeführt. Die Beurteilung des Parasitengehaltes des Blutes in Mikrohämatokrit-Kapillaren erfolgte nach Zentrifugation (8 Min.; 13.000 U/Min. = 17.000 g; Zentrifuge : Ekko, Fa. Collatz, Berlin) bei 125facher Vergrößerung.

Methode nach WOO (1969):

- : keine Trypanosomen/Kapillare
- + : 1-10 Trypanosomen/Kapillare
- 2+ : 10-50 Trypanosomen/Kapillare
- 3+ : 50-100 Trypanosomen/Kapillare
- 4+ : massenhaft Trypanosomen/Kapillare

Isolierung der Parasiten

Zur Isolierung der Parasiten wurden männliche Mäuse mit hoher Parasitämie in Äthernarkose entblutet (Antikoagulans: Vetren^R, Fa. Promonta, Hamburg). Die Trennung der Trypanosomen von Blutbestandteilen erfolgte nach der Methode von LANHAM (1968) und LANHAM und GODFREY (1970). Dabei wurde DEAE-Sephadex-A 50-Cellulose (Fa. Pharmacia, Uppsala) verwendet.

Das nach LANHAM isolierte Trypanosomen-PSG-Gemisch wurde in 50 ml Gefäßen austariert und bei 1300 U/Min. (300 g) über 45 Min. zentrifugiert (Zentrifuge: Roto Silenta III, Fa. Hettich, Tuttlingen). Da das Trypanosomensediment einen hohen PSG-Anteil aufwies, erfolgte eine nochmalige Zentrifugation (Zentrifuge Z 31, Fa. Vetter, Wiesloch) bei 1300 U/Min. (220 g). Danach wurde der PSG-Überstand mit einer Pasteur-Pipette entfernt.

Bei Anwendung dieser Methode konnten aus dem hochparasitierten Blut von 20 ausgewachsenen Mäusen (durchschnittlich 35 ml) 1,5-2,0 ml isolierte Trypanosomen gewonnen werden.

Färbung

Die morphologischen Untersuchungen isolierter Trypanosomen wurden an Giemsa-färbten Präparaten vorgenommen. Die Färbung erfolgte nach der vom Hersteller (Merck AG, Darmstadt) angegebenen Methode.

β -Propiolacton

Zur Abtötung der Parasiten bzw. zur Beeinflussung ihrer Überlebenszeit und Infektiosität kam β -Propiolacton (3-Hydroxypropionolacton, $C_3H_4O_2$) reinst (Fa. Serva, Heidelberg) in 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025 und 0,0125%igen Konzentrationen zur Anwendung. Zur Herstellung der gewünschten Konzentration wurde die Substanz kurz vor Versuchsbeginn in PSG-Puffer angesetzt. Die Einwirkungszeit von BPL auf die Trypanosomen betrug je nach Versuchsziel 1-300 Min. bei 0°C (Eiswasserbad).

Prüfung der Toxizität von β -Propiolacton

Die orientierende Toxizitätsprüfung wurde an jeweils 2, 5 und 15 Mäusen in der Dosierung von 0,2 und 0,5 ml vorgenommen. Folgende Konzentrationen der BPL-PSG-Lösung kamen zur Anwendung: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0 und 2,5%. Das BPL wurde vor der Injektion stets frisch mit PSG-Puffer bei 0°C angesetzt und unmittelbar danach den Versuchstieren i.p. verabreicht.

Prüfung der Überlebensdauer von *T. evansi* in verschiedenen Konzentrationen der BPL-PSG-Lösung

Der Test wurde mit isolierten, lebenden Trypanosomen (0,1 ml aus dem Parasitensediment) in BPL-PSG-Lösung (2,4 ml) bei 0°C durchgeführt. Dabei kamen BPL-PSG-Lösungen in der Konzentration von 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 und 0,1% zur Anwendung. Die Untersuchung erfolgte in 4 ml PS-Röhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen).

Die Bewegungsaktivität der Trypanosomen wurde in Zeitabständen von 10 Min. im Nativpräparat mikroskopisch bei 500facher Vergrößerung untersucht und beurteilt. Das Material für die morphologische Untersuchung (Giemsa-gefärbte Präparate) wurde in gleichen Zeitabständen bzw. bei einigen Untersuchungen in Abständen von 30 Min. entnommen. Nach Einwirkung der jeweiligen BPL-PSG-Lösung fand eine Beurteilung nach folgendem Schema statt:

- 5 : Mehrzahl der T/GF⁺ bewegungsaktiv
- 4 : annähernd 2/3 der T/GF bewegungsaktiv
- 3 : annähernd 1/3 der T/GF bewegungsaktiv
- 2 : wenige T (2-5 T/GF) bewegungsaktiv
- 1 : einzelne T (1-2 T/GF) bewegungsaktiv
- : Bewegungslosigkeit

⁺T/GF = Trypanosomen pro Gesichtsfeld

Beeinflussung der Infektiosität von *T. evansi* durch verschiedene Konzentrationen der BPL-PSG-Lösung

Die Infektiosität von *T. evansi* wurde nach Einwirkung von 1; 0,6; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025 und 0,0125%igen BPL-PSG-Lösungen untersucht. Dazu fand in Intervallen von 2, 5, 10 und 30 Min. eine Übertragung der Trypanosomen aus den jeweiligen BPL-Konzentrationsgruppen auf jeweils 3 bzw. 5 Mäuse statt.

Herstellung des Antigens

Die Herstellung des Antigens erfolgte in der Weise, daß aus dem Sediment entnommene Trypanosomen 10 bzw. 90 Min. lang 0,6%igen BPL-PSG-Lösungen ausgesetzt waren. Die verschiedenen T. evansi-Suspensionen wurden dabei nach folgendem Schema hergestellt:

0,025 ml T⁺ + 2,475 ml BPL-PSG-Lsg. = 2,5 ml einer 1%igen T-BPL-PSG-Susp.

0,05 ml T + 2,45 ml BPL-PSG-Lsg. = 2,5 ml einer 2%igen T-BPL-PSG-Susp.

0,1 ml T + 2,4 ml BPL-PSG-Lsg. = 2,5 ml einer 4%igen T-BPL-PSG-Susp.

0,2 ml T + 2,3 ml BPL-PSG-Lsg. = 2,5 ml einer 8%igen T-BPL-PSG-Susp.

⁺T = Trypanosomen

Die Lyophilisierung der Trypanosomen erfolgte in einer Gefriertrocknungsanlage (BETA A, Fa. Christ, Osterode/Harz).

Immunisierung der Mäuse

Bei den Immunisierungsversuchen wurden den Mäusen isolierte lebende und gefriergetrocknete Trypanosomen in 4%igen, abgetötete Parasiten in 1, 2, 4 und 8%igen Konzentrationen verabreicht. Dabei wurden Mäuse mit abgetötetem Antigen einmal bzw. zweimal im Abstand von einer Woche immunisiert. Die restlichen Versuchstiere erhielten nur eine einzige Immunisierungsdosis. Die Anzahl der Mäuse pro Versuchstiergruppe betrug 10 Tiere.

Belastungsinfektion und Kontrolle des Infektionsverlaufs

Zur Durchführung der Belastungsinfektion, die stets 6 Wochen nach Verabreichung der letzten Immunisierungsdosis stattfand, wurde 0,01 ml hochparasitäres Vollblut mit Trypanosomenflüssigkeit nach MUHLPFORDT (1964) versetzt und die Anzahl der Erreger in der Thoma-Kammer ausgezählt.

Parasitensuspensionen von 20; 200; 2000; 20.000; 200.000 und 2.000.000 Trypanosomen wurden in Verdünnungsreihen unter Verwendung von BSG-Puffer nach TAYLOR, LANHAM und WILLIAMS (1974) bei Raumtemperatur hergestellt und den Mäusen i.p. verabreicht. Im Kontrollversuch erhielten jeweils 5 Mäuse dieselbe Erregeranzahl i.p..

Der Beobachtungszeitraum für den Infektionsverlauf betrug 6 Wochen p.i..
Eine Blutentnahme der Mäuse für den WOO-Test erfolgte in der ersten Woche
p.i. zweimal, danach einmal wöchentlich.

B. Ergebnisse

1. Prüfung der Toxizität von β -Propiolacton (β PL) an Mäusen

Die Toxizitätsprüfung wurde an 54 Mäusen durchgeführt. Dabei kamen folgende β PL-Konzentrationen (in PSG-Puffer) zur Anwendung: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0 und 2,5%. Die Lösungen wurden in der Dosierung von 0,2 bzw. 0,5 ml/Maus i.p. verabreicht. Die Beobachtungszeit betrug 6 Wochen post applicationen (p. appl.).

Im ersten Versuch erhielten jeweils 2 Mäuse 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 und 1%ige β PL-Konzentrationen in der Dosierung von 0,2 ml. Alle Tiere überlebten bis zum Abschluß der Beobachtungszeit symptomfrei.

In einem weiteren Versuch wurden an 15 Mäusen 1%ige sowie an jeweils 5 Mäusen 0,2; 0,6; 1,5; 2,0 und 2,5%ige β PL-Konzentrationen verabreicht. Die Dosierung betrug 0,5 ml/Maus. Bei β PL in der Konzentration von 0,2 und 0,6% überlebten alle Mäuse symptomfrei.

Nach Verabreichung der 1%igen β PL-PSG-Lösung überlebten 12 der 15 Mäuse. 3 Mäuse verendeten am 4. bzw. 5. Tag p. appl.. Bei allen Mäusen traten in den ersten 3 Tagen nach Verabreichung von β PL folgende Symptome in leichter bis mittelgradiger Form auf: Untertemperatur, struppiges Fell, zyanotische Schleimhäute und Inappetenz.

Nach Verabreichung von 1,5; 2,0 und 2,5%igen β PL-Konzentrationen verendeten alle Mäuse 2-3 Tage p. appl. (Tab. 1).

Tab. 1: Toxizitätsprüfung von β -Propiolacton an Mäusen

Zahl der Mäuse	β PL-Konz. (%)	Verabreichte Menge der β PL-PSG-Lösung (ml)	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.appl.	Klinische Symptome
2	0,001	0,2	-	-	-
2	0,005	0,2	-	-	-
2	0,01	0,2	-	-	-
2	0,05	0,2	-	-	-
2	0,1	0,2	-	-	-
2	0,5	0,2	-	-	-
2	1,0	0,2	-	-	-
5	0,2	0,5	-	-	-
5	0,6	0,5	-	-	-
15	1,0	0,5	3	4-5	⁺
5	1,5	0,5	5	2-3	+
5	2,0	0,5	5	2-3	+
5	2,5	0,5	5	2-3	+

⁺Untertemperatur, Inappetenz, zyanotische Schleimhäute, struppiges Fell.

2. Überlebenszeit von T. evansi in unterschiedlichen β -Propiolacton-Konzentrationen

In diesem Versuch sollte die Überlebenszeit von T. evansi in 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 und 0,1%igen β PL-Konzentrationen geprüft werden. Hierzu wurden isolierte, lebende Parasiten (0,1 ml) verschiedenen β PL-PSG-Lösungen (2,4 ml) bei 0°C ausgesetzt. Die Beurteilung der Bewegungsaktivität erfolgte im Nativpräparat in Zeitabständen von 10 Min. Eine tabellarische Übersicht der Überlebenszeiten wird in Tab. 2 gegeben. Es ergaben sich folgende Werte: In den 1 und 0,9%igen Lösungen war die Mehrzahl der Parasiten nach 10 Min. abgetötet, die übrigen zeigten stark reduzierte Geißelbewegung. Bei keiner der beiden

Gruppen war nach 60 Min. eine Bewegungsaktivität feststellbar.

Bei der Einwirkung von 0,8; 0,7; 0,6 und 0,5%igen β PL-PSG-Lösungen waren bis zu 10 Min. bei der 0,8%igen, bis zu 20 Min. bei der 0,7%igen und bis zu 30 Min. bei der 0,6 und 0,5%igen β PL-PSG-Lösung noch 30% der Trypanosomen pro Gesichtsfeld bewegungsaktiv. Nach 20 Min. bei der 0,8%igen, nach 30 Min. bei der 0,7%igen und nach 40 Min. bei der 0,6 und 0,5%igen β PL-Konzentration fand eine weitere deutliche Abnahme der Motilität statt. Die völlige Bewegungslosigkeit der Trypanosomen wurde bei der 0,8 und 0,7%igen nach 70 Min., bei der 0,6%igen nach 90 Min. und bei der 0,5%igen β PL-PSG-Lösung nach 110 Min. beobachtet.

In der β PL-Konzentration von 0,4; 0,3; 0,2 und 0,1% war die Bewegungsaktivität der überwiegenden Mehrzahl der Trypanosomen bis zu 40 Min. bei der 0,4%igen, bis zu 60 Min. bei der 0,3%igen, bis zu 110 Min. bei der 0,2%igen und bis zu 150 Min. bei der 0,1%igen β PL-PSG-Lösung nicht eingeschränkt. Im folgenden Zeitraum von 30-60 Min. verringerte sich der Anteil bewegungsaktiver Trypanosomen auf 30%. Nach 80 Min. bei der 0,4%igen, nach 120 Min. bei der 0,3%igen, nach 180 Min. bei der 0,2%igen und nach 220 Min. bei der 0,1%igen β PL-PSG-Lösung fand eine deutliche Abnahme der Bewegungsaktivität statt. Die völlige Bewegungslosigkeit der Parasiten wurde bei der 0,4%igen nach 140 Min., bei der 0,3%igen nach 190 Min., bei der 0,2%igen nach 240 Min. und bei der 0,1%igen β PL-Konzentration nach 300 Min. festgestellt.

Tab. 2: Bewegungsaktivität von *T. evansi* nach Einwirkung unterschiedlicher β -Propiolacton-Konzentrationen

Einwirkungs- zeit von BPL (Min.)	BPL-Konzentration (%)									
	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
10	2	2	3	3	3	3	4	5	5	5
20	2	2	2	3	3	3	4	5	5	5
30	2	2	2	2	3	3	4	4	5	5
40	1	1	1	2	2	2	4	4	5	5
50	1	1	1	2	2	2	3	4	5	5
60	-	-	1	2	2	2	3	4	4	5
70			-	1	1	2	3	3	4	5
80				-	1	1	2	3	4	4
90					-	1	2	3	4	4
100						1	2	3	4	4
110						-	2	3	4	4
120							2	2	3	4
130							1	2	3	4
140							1	2	3	4
150							-	2	3	4
160								2	3	3
170								1	3	3
180								1	2	3
190								-	2	3
200									2	3
210									2	3
220									1	2
230									1	2
240									-	2
250										2
260										2
270										1
280										1
290										1
300										-

Anmerkung: Die angegebenen Zahlen bedeuten den jeweiligen Grad der Bewegungsaktivität:

- 5 : Mehrzahl der T/GF bewegungsaktiv
- 4 : annähernd 2/3 der T/GF bewegungsaktiv
- 3 : annähernd 1/3 der T/GF bewegungsaktiv
- 2 : wenige T (2-5 T/GF) bewegungsaktiv
- 1 : einzelne T (1-2 T/GF) bewegungsaktiv
- : Bewegungslosigkeit

3. Morphologische Veränderungen von T. evansi nach Einwirkung von β -Propiolacton

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte am gefärbten Präparat (Giemsa) die morphologische Veränderung von T. evansi nach Einwirkung verschiedener BPL-Konzentrationen beurteilt werden. Dabei wurden isolierte, lebende Parasiten (0,1 ml) einer 1; 0,6 und 0,2%igen BPL-PSG-Lösung (2,4 ml) bei 0°C ausgesetzt. In Zeitintervallen von 10 Min. bei der 1 und 0,6%igen bzw. 30 Min. bei der 0,2%igen BPL-Konzentration wurden Ausstriche angefertigt und bei 1250facher Vergrößerung beurteilt.

Nach Einwirkungszeiten von 10 Min. bei der 1 und 0,6%igen bzw. 30 Min. bei der 0,2%igen BPL-PSG-Lösung traten bei der Mehrzahl der Trypanosomen keine morphologischen Veränderungen auf, bei den übrigen wurden folgende Veränderungen beobachtet: Geißelabtrennung, intraplasmatische Granula, extraplasmatische Kernverlagerung, Teilung des Kerns in zwei abgerundete kompakte Körper, leere Zytoplasmahüllen sowie aufgequollene und abgerundete Trypanosomen, teilweise mit und teilweise ohne Kern.

Bei zunehmender Konzentration und Einwirkungsdauer von 10-60 Min. bei der 1%igen, 10-90 Min. bei der 0,6%igen und 30-240 Min. bei der 0,2%igen BPL-Konzentration war die Zahl der aufgequollenen Trypanosomen sowie der ballonierten Rundformen gegenüber den morphologisch intakten Parasiten nur geringgradig vermehrt. Als hauptsächlichste Veränderungen traten starke Granulaansammlung im Zytoplasma, vermehrte Teilungen des Kerns und Geißelabtrennungen in allen Präparaten gleichmäßig auf.

Bei Präparaten von Kontrollen, bei denen die Parasiten ausschließlich PSG-Puffer ausgesetzt waren, wurden nach entsprechenden Zeiten vereinzelte morphologische Veränderungen festgestellt.

4. Einfluß von β -Propiolacton auf die Infektiosität von *T. evansi*

In diesen Versuchen sollte nachgewiesen werden, ob und gegebenenfalls bei welcher Konzentration die Einwirkung von BPL auf *T. evansi* eine Veränderung der Infektiosität bewirkt. Sowohl die Einwirkungszeiten als auch die BPL-Konzentration wurden dabei variiert. Die Suspension (0°C) bestand aus 2,4 ml der BPL-Pufferlösung in gewünschter Konzentration und aus 0,1 ml isolierter, lebender Trypanosomen. Die Untersuchungen erfolgten an jeweils 5 bzw. 3 Mäusen, wobei die Trypanosomen in den einzelnen Konzentrationen in Dosierungen von 0,2 und 0,5 ml i.p. verabreicht wurden. In der ersten Woche p.i. wurde das Blut der Mäuse zweimal, danach einmal wöchentlich im WOO-Test untersucht.

Für Kontrollversuche wurden Parasiten in PSG-Puffer ohne Zusatz von BPL gehalten und danach auf jeweils 3 bzw. 5 Mäuse in gleicher Dosierung i.p. übertragen. Die Tiere verendeten 2-4 Tage p.i..

1. Versuch:

In Verbindung mit meinen bei vorausgegangenen Untersuchungen zur Überlebenszeit von *T. evansi* gewonnenen Erkenntnissen wurden folgende Konzentrationsgruppen ausgewählt: 1,0; 0,6 und 0,2%. Die Inkubationsdauer der Trypanosomen in den einzelnen β PL-PSG-Lösungen hing von der Überlebenszeit der Parasiten in den jeweiligen Konzentrationen ab (vgl. Tab. 2). Die Untersuchungen erfolgten an jeweils 5 Mäusen, wobei die Trypanosomen-BPL-PSG-Suspensionen in Dosierungen von 0,2 bzw. 0,5 ml verabreicht wurden.

In diesem Versuch betrugen die Einwirkungszeiten bei der 1%igen 2-50 Min., bei der 0,6%igen 2-80 Min. und bei der 0,2%igen BPL-PSG-Lösung 2-210 Min. Die Übertragung der Trypanosomen erfolgte während der ersten 10 Min. bei der 1,0; 0,6 und 0,2%igen BPL-Konzentration im Abstand von 2 Min., danach bei der 1 und 0,6%igen im Abstand von 10 Min. bzw. bei der 0,2%igen im Abstand von 30 Min. Dabei ergab sich folgendes Bild: Nach der Übertragung von Parasiten, die 2-50 Min. der 1%igen, 2-80 Min. der 0,6%igen und 4-210 Min. der 0,2%igen BPL-Konzentration ausgesetzt waren, entwickelte sich bei keinem Versuchstier eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie. Ebenfalls fehlten klinische Krankheits Symptome. Dagegen führten Trypanosomen, die

2 Min. einer 0,2%igen BPL-PSG-Lösung ausgesetzt waren, bei 2 Mäusen zu einer ansteigenden Parasitämie. Die Versuchstiere verendeten am 22. und 24. Tag p.i.. Die restlichen 3 Mäuse der Gruppe zeigten weder eine Parasitämie noch klinische Krankheitssymptome (Tab. 3).

2. Versuch:

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß in der niedrigsten BPL-Konzentration von 0,2% die Mehrzahl der Trypanosomen ihre Infektiosität verloren hatten, sollte in folgendem Versuch die Einwirkung schwächerer Konzentrationen geprüft werden. Dazu wurden die Parasiten 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025 und 0,0125%igen BPL-PSG-Lösungen ausgesetzt. Die Einwirkungszeit betrug für jede Konzentration 2 bzw. 5 Min. bei 0°C. Die Übertragung der Trypanosomen erfolgte an jeweils 3 Mäusen in der Dosierung von 0,5 ml.

Trypanosomen, die 2 Min. BPL-PSG-Lösungen in der Konzentration von 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 und 0,15% ausgesetzt waren, führten stets zur Infektion. Die Mäuse verendeten nach hoher Parasitämie 6-20 Tage p.i..

Nach Exposition in der 0,2%igen BPL-Konzentration führten die Trypanosomen bei 2/3 der Mäuse zur Parasitämie. Die Versuchstiere verendeten am 18. bzw. 20. Tag p.i. Eine Maus überlebte symptomfrei ohne Parasitenbefall.

Trypanosomen, die 5 Min. 0,0125; 0,025; 0,05 und 0,1%igen BPL-PSG-Lösungen ausgesetzt waren, erzeugten bei allen Mäusen eine Infektion, die nach 6-21 Tagen zum Tod führte.

Nach Einwirkung der 0,15 und 0,2%igen BPL-Konzentration überlebten 5 von 6 Mäusen symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie. Eine Maus verendete nach ansteigender Parasitämie am 19. Tag p.i. (Tab. 4).

Tab. 3: Einfluß von β -Propiolacton auf die Infektiosität von *T. evansi*

Zahl der Mäuse	β PL- Konz. (%)	Einwirkungs- zeit von β PL (Min.)	Inokulum (ml)	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p. i.
5	1	2	0,2	-	-
5	1	4	0,2	-	-
5	1	6	0,2	-	-
5	1	8	0,2	-	-
10	1	10	0,2	-	-
5	1	20	0,2	-	-
5	1	30	0,2	-	-
5	1	40	0,2	-	-
5	1	50	0,2	-	-
5	0,6	2	0,5	-	-
5	0,6	4	0,5	-	-
5	0,6	6	0,5	-	-
5	0,6	8	0,5	-	-
5	0,6	10	0,5	-	-
5	0,6	10	0,2	-	-
5	0,6	20	0,2	-	-
5	0,6	30	0,2	-	-
5	0,6	40	0,2	-	-
5	0,6	50	0,2	-	-
5	0,6	60	0,2	-	-
5	0,6	70	0,2	-	-
5	0,6	80	0,2	-	-
5	0,2	2	0,5	2	22-24
5	0,2	4	0,5	-	-
5	0,2	6	0,5	-	-
5	0,2	8	0,5	-	-
5	0,2	10	0,5	-	-
5	0,2	30	0,2	-	-
5	0,2	60	0,2	-	-
5	0,2	90	0,2	-	-
5	0,2	120	0,2	-	-
5	0,2	150	0,2	-	-
5	0,2	180	0,2	-	-
5	0,2	210	0,2	-	-

Tab. 4: Einfluß von β -Propiolacton auf die Infektiosität von *T. evansi*

Zahl der Mäuse	β PL-Konz. (%)	Einwirkungszeit von β PL (Min.)	Inokulum (ml)	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.
3	0,0125	2	0,5	3	6-7
3	0,025	2	0,5	3	6
3	0,05	2	0,5	3	6
3	0,1	2	0,5	3	6-7
3	0,15	2	0,5	3	16-20
3	0,2	2	0,5	2	18-20
3	0,0125	5	0,5	3	6
3	0,025	5	0,5	3	6-15
3	0,05	5	0,5	3	6-15
3	0,1	5	0,5	3	17-21
3	0,15	5	0,5	1	19
3	0,2	5	0,5	-	-

5. Untersuchungen zur Immunisierung mit *T. evansi*

a. Immunisierung mit lebenden Parasiten

In diesem Versuch sollte die immunisierende Wirkung isolierter, lebender Parasiten in 4%iger Konzentration geprüft werden. Hierzu wurden lebende Parasiten (0,1 ml) 10 Min. einer 0,6%igen β PL-PSG-Lösung (2,4 ml) bei 0°C ausgesetzt. Die Untersuchungen erfolgten an insgesamt 50 Mäusen, wobei die vermehrungsunfähigen Trypanosomen (vgl. Tab. 3) in der einmaligen Dosierung von 0,5 ml i.p. verabreicht wurden.

Zur Prüfung der immunisierenden Wirkung erhielten jeweils 10 Mäuse, bei einer 6 Wochen später durchgeführten Belastungsinfektion 200, 2000, 20.000, 200.000 und 2.000.000 Trypanosomen/Maus p.i.. Die Beobachtungszeit betrug 6 Wochen p.i.. Das Blut der Mäuse wurde dabei in der ersten Woche p.i. zweimal, danach einmal wöchentlich im WOO-Test untersucht.

Bei den Kontrollversuchen wurde jeweils 5 Mäusen die gleiche Anzahl von Trypanosomen in BSG-Puffer ohne β PL-Puffer i.p. verabreicht. Die Versuchstiere verendeten nach 4-18 Tagen.

Nach einer Belastungsinfektion mit 200, 2000 und 20.000 Parasiten zeigte keine Maus eine Parasitämie oder Krankheitssymptome. Nach Übertragung von 200.000 Trypanosomen überlebten 9 von 10 Mäusen parasiten- und symptomfrei. Eine Maus verendete am 11. Tag p.i. nach ansteigender Parasitämie. Nach Übertragung von 2.000.000 Trypanosomen verendeten 4 von 10 Mäusen nach hohem Parasitenbefall am 16. Tag p.i. Die übrigen 6 Mäuse entwickelten weder eine Parasitämie noch Krankheitssymptome (Tab. 5).

Tab. 5: Untersuchungen zur einmaligen Immunisierung mit lebenden T. evansi

Zahl der Mäuse	βPL-Konz. (%)	Einwirkungszeit von βPL (Min.)	Antigen-dosis (ml/Maus)	Antigen-konz. + (%)	Belastungsinfektion (Parasiten/Maus)	Parasitämie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.	Oberlebenszeit der Kontrollmäuse (Tage)
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	9-18
10	0,6	10	0,5	4	2.000	-	-	-	7-12
10	0,6	10	0,5	4	20.000	-	-	-	7-10
10	0,6	10	0,5	4	200.000	+	1	11	5-8
10	0,6	10	0,5	4	2.000.000	+	4	16	4-6

+ jeweils 0,1 ml Parasiten in 2,4 ml βPL-PSG-Lösung

b. Immunisierung mit abgetöteten Parasiten

In diesen Untersuchungen sollte die immunisierende Wirkung isolierter, abgetöteter Parasiten in 1; 2; 4 und 8%iger Konzentration geprüft werden. Zur Abtötung der Trypanosomen wurden lebende Parasiten (jeweils 0,025; 0,05; 0,1 und 0,2 ml) einer 0,6%igen BPL-PSG-Lösung (je 2,475; 2,45; 2,4 und 2,3 ml) 90 Min. bei 0°C ausgesetzt.

Es wurden 220 Mäuse einmal und 200 Mäuse zweimal im Abstand von einer Woche i.p. immunisiert. Bei der einmaligen Immunisierung wurden jeweils 50 Mäusen 1 bzw. 8%ige und jeweils 60 Mäusen 2 bzw. 4%ige Trypanosomen-BPL-PSG-Suspensionen verabreicht. Bei der zweimaligen Immunisierung erhielten jeweils 50 Mäuse 1, 2, 4 und 8%iges Antigen. Die Dosierung betrug 0,5 ml/Maus.

Zur Prüfung der immunisierenden Wirkung der unterschiedlichen Antigen-Konzentrationen wurde 6 Wochen nach der letzten Verabreichung von Antigen eine Belastungsinfektion durchgeführt. Dabei erhielten je 10 Mäuse 20, 200, 2000, 20.000, 200.000 und 2.000.000 Parasiten/Maus. Die Übertragung der Trypanosomen erfolgte i.p.. Das Blut der Mäuse wurde in der ersten Woche p.i. zweimal, danach einmal wöchentlich im WOO-Test untersucht. Die Beobachtungszeit betrug 6 Wochen p.i..

In den Kontrollversuchen wurden jeweils 5 Mäuse mit derselben Anzahl von Parasiten in BSG-Puffer ohne BPL i.p. infiziert. Die Mäuse verendeten 5-22 Tage p.i. (Tab. 6, 6a, 7, 7a).

Die Belastungsinfektion nach einmaliger Immunisierung ergab folgendes Bild: Nach Übertragung von 20, 200, 2000 und 20.000 Parasiten entwickelten sich in keinem Versuchstier, das 1, 2, 4 und 8%iges Antigen erhalten hatte, eine Parasitämie oder Krankheitssymptome.

Nach Übertragung von 200.000 Trypanosomen/Maus auf insgesamt 40 Mäuse überlebten jeweils 5 von 10, die mit 1 bzw 2%igem, 3 von 10, die mit 4%igem und 2 von 10, die mit 8%igem Antigen immunisiert wurden. Bei keinem der Versuchstiere wurden Parasiten oder klinische Symptome beobachtet. Die übrigen 25 Mäuse verendeten 3-17 Tage p.i. nach hoher Parasitämie.

Nach Übertragung von 2.000.000 Parasiten überlebte je eine Maus, die 2, 4 bzw. 8%iges Antigen erhalten hatte, symptomfrei. 35 Mäuse verendeten nach ansteigender Parasitämie 6-13 Tage p.i.. Zwei Mäuse, denen 4 bzw. 8%ige Trypanosomen- β PL-PSG-Suspensionen verabreicht wurde, verendeten interkurrent vor der Belastungsinfektion (Tab. 6, 6a).

Bei der zweimaligen Immunisierung zeigte sich folgendes Resultat: Nach Übertragung von 200 und 2000 Parasiten verendete in der Konzentrationsgruppe mit 4%igem Antigen eine der 8 Mäuse (200 Parasiten/Maus) nach ansteigender Parasitämie am 15. Tag p.i.. Zwei Mäuse dieser Gruppe verendeten interkurrent vor der Belastungsinfektion. Zwei Mäuse der Gruppe mit 4%igem sowie eine Maus der Gruppe mit 2%igem Antigen, die mit 2000 Trypanosomen infiziert wurden, zeigten am 15. und 22. Tag p.i. einen mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall (WOO-Test).

Danach trat bis zum Ende der Beobachtungszeit keine Parasitämie mehr auf. Die Tiere überlebten ohne Zeichen klinischer Symptome. Die übrigen Mäuse der 1, 2, 4 und 8%igen Antigen-Konzentrationen überlebten ohne klinische Erkrankung und ohne nachweisbare Parasitämie.

Nach der Belastungsinfektion mit 20.000 Parasiten verendeten 2 von 10 Mäusen, die mit 1%igem sowie jeweils eine Maus, die mit 2 bzw. 4%igem Antigen immunisiert waren 7-21 Tage p.i.. Die übrigen 36 Mäuse entwickelten weder eine Parasitämie noch Krankheitssymptome.

Nach Übertragung von 200.000 Trypanosomen überlebten jeweils 3 Mäuse aus der Gruppe mit 2 bzw. 4 %igem Antigen sowie 4 Mäuse mit 8%igem Antigen. Die Versuchstiere zeigten weder Zeichen klinischer Symptome, noch eine nachweisbare Parasitämie. Die restlichen 30 Mäuse verendeten 8-14 Tage p.i..

Keine Maus der verschiedenen Antigenkonzentrationen, die mit 2.000.000 Parasiten belastet wurden, überlebten. Der Tod trat 8-11 Tage p.i. ein.

Tab. 6: Untersuchungen zur einmaligen Immunisierung mit abgetöteten *T. evansi*

Zahl der Mäuse	3PL-Konz. (%)	Einwirkungszeit von 3PL (Min.)	Antigenkonz. (%)	Antigenkonz. (ml)	Belastungsinfektion (Parasiten/Maus)	Parasitätie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.	Oberlebenszeit der Kontrollmäuse (Tage)
10	0,6	90	1	0,5	200	-	-	-	9-16
10	0,6	90	1	0,5	2.000	-	-	-	9-13
10	0,6	90	1	0,5	20.000	-	-	-	7-13
10	0,6	90	1	0,5	200.000	+	5	3-9	6-7
10	0,6	90	1	0,5	2.000.000	+	10	7-9	5-6
10	0,6	90	2	0,5	20	-	-	-	8-22
10	0,6	90	2	0,5	200	-	-	-	8-12
10	0,6	90	2	0,5	2.000	-	-	-	9-11
10	0,6	90	2	0,5	20.000	-	-	-	6-11
10	0,6	90	2	0,5	200.000	+	5	10-17	6-7
10	0,6	90	2	0,5	2.000.000	+	9	6-8	5-6

*Jeweils 0,025 bzw. 0,05 ml Parasiten in je 2,475 bzw. 2,45 ml 3PL-PSG-Lösung

Tab. 6a: Untersuchungen zur einmaligen Immunisierung mit abgetöteten *T. evansi*

Zahl der Mäuse	BPL-Konz. (%)	Einwirkungszeit von BPL (Min.)	Antigenkonz. (mg/ml)	Antigenkonz. (%)	Belastungsinfektion (Parasiten/Maus)	Parasitämie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.l.	Oberlebenszeit der Kontrollmäuse (Tage)
10	0,6	90	0,5	4	20	-	-	-	8-22
10	0,6	90	0,5	4	200	-	-	-	8-12
10	0,6	90	0,5	4	2.000	-	-	-	9-11
10	0,6	90	0,5	4	20.000	-	-	-	6-11
10	0,6	90	0,5	4	200.000	+	7	8-13	6-7
10	0,6	90	0,5	4	2.000.000	+	9 ⁺⁺	7-9	5-6
10	0,6	90	0,5	8	200	-	-	-	8-17
10	0,6	90	0,5	8	2.000	-	-	-	10-12
10	0,6	90	0,5	8	20.000	-	-	-	7-9
10	0,6	90	0,5	8	200.000	+	8	8-11	6-7
10	0,6	90	0,5	8	2.000.000	+	9 ⁺⁺	7-8	5-6

⁺ jeweils 0,1 bzw. 0,2 ml Parasiten in je 2,4 bzw. 2,3 ml BPL-PSG-Lösung

⁺⁺ je eine Maus verwendete interkurrent vor der Belastungsinfektion

Tab. 7: Untersuchungen zur zweimaligen Immunisierung mit abgetöteten *T. evansi*

Zahl der Mäuse	BPL-Konz. (%)	Einwirkungszeit von BPL (Min.)	Antigendosis (ml)	Antigenkonz. (%)	Belastungsinfektion (Parasiten/Maus)	Parasitämie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.	Überlebenszeit d. Kontrollmäuse (Tage)
10	0,6	90	0,5	1	200	-	-	-	8-17
10	0,6	90	0,5	1	2.000	-	-	-	8-12
10	0,6	90	0,5	1	20.000	+	2	12	6-10
10	0,6	90	0,5	1	200.000	+	10	8-14	6,7
10	0,6	90	0,5	1	2.000.000	+	10 ⁺⁺	8-10	5-6
10	0,6	90	0,5	2	200	-	-	-	8-15
10	0,6	90	0,5	2	2.000	+	-	-	8-11
10	0,6	90	0,5	2	20.000	+	1	21	6-10
10	0,6	90	0,5	2	200.000	+	7	10-11	6-7
10	0,6	90	0,5	2	2.000.000	+	10	9-11	5-6

⁺ jeweils 0,025 bzw. 0,05 ml Parasiten in je 2,475 bzw. 2,45 ml BPL-PSG-Lösung

⁺⁺ Mäuse verendet interkurrent vor der Belastungsinfektion

Tab. 7a: Untersuchungen zur zweimaligen Immunisierung mit abgetöteten *T. evansi*

Zahl der Mäuse	BPL-Konz. (%)	Einwirkungszeit (Min.)	Antigen-dosis (ml)	Antigen-konz. (%)	Belastungsinfektion (Parasiten/Maus)	Parasitämie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.	Überlebenszeit d. Kontrollmäuse (Tage)
10	0,6	90	0,5	4	200	+	3 ⁺⁺	15	8-15
10	0,6	90	0,5	4	2.000	+	-	-	8-11
10	0,6	90	0,5	4	20.000	+	1	7	6-10
10	0,6	90	0,5	4	200.000	+	7	9-20	6-7
10	0,6	90	0,5	4	2.000.000	+	10	9-10	5-6
10	0,6	90	0,5	8	200	-	-	-	9-19
10	0,6	90	0,5	8	2.000	-	-	-	10-12
10	0,6	90	0,5	8	20.000	-	-	-	7-10
10	0,6	90	0,5	8	200.000	+	6	10-13	6-7
10	0,6	90	0,5	8	2.000.000	+	10	9-13	5-6

⁺ jeweils 0,1 bzw. 0,2 ml Parasiten in je 2,4 bzw. 2,3 ml BPL-PSG-Lösung

⁺⁺ 2 Mäuse verendeten interkurrent vor der Belastungsinfektion

c. Immunisierung mit lyophilisierten Parasiten

Bei diesem Versuch sollte die immunisierende Wirkung isolierter, lyophilisierter Parasiten in 4%iger Konzentration untersucht werden. Dazu wurden lebende Parasiten (0,1 ml) einer 0,6%igen BPL-PSG-Lösung (2,4 ml) bei 0°C ausgesetzt und nach 10 Min. gefriergetrocknet. Die Trocknung war nach 6 Stunden abgeschlossen. Die Aufbewahrung der lyophilisierten Parasiten erfolgte bei -4°C über einen Zeitraum von 2 Wochen.

Vor Verwendung wurde das Antigen (0,1 ml) mit Aqua pro injectione (2,4 ml) versetzt, so daß die Endkonzentration der Trypanosomen 4% betrug. Die Untersuchung erfolgte an 50 Mäusen. Das Antigen wurde in der einmaligen Dosierung von 0,5 ml/Maus i.p. verabreicht. Die Belastungsinfektion fand 6 Wochen danach statt, wobei auf jeweils 10 Mäuse 200, 2.000, 20.000, 200.000 und 2.000.000 Trypanosomen/Maus i.p. übertragen wurden.

Die Beobachtungszeit betrug 6 Wochen p.i.. In der ersten Woche p.i. wurde das Blut der Mäuse zweimal, danach einmal wöchentlich im W00-Test untersucht. Im Kontrollversuch erhielten jeweils 5 Mäuse die gleiche Anzahl von Parasiten in BSG-Puffer ohne BPL. Die Übertragung der Trypanosomen erfolgte i.p.. Die Versuchstiere verendeten 5-16 Tage p.i..

Nach der Belastungsinfektion mit 200 und 20.000 Parasiten entwickelten sich bei keinem Versuchstier weder eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie noch klinische Krankheitssymptome.

Nach Übertragung von 2.000, 200.000 und 2.000.000 Trypanosomen verendete eine von 10 Mäusen, die mit 2.000 Parasiten belastet wurden nach hoher Parasitämie am 24. Tag p.i.. Die übrigen 9 Versuchstiere überlebten parasiten- und symptomfrei. 6 von 10 Mäusen, die 200.000 Trypanosomen erhielten, überlebten symptomfrei ohne Parasitämie. Die restlichen 4 Mäuse verendeten nach ansteigendem Parasitenbefall 10-37 Tage p.i.. Eine Maus, der 2.000.000 Parasiten verabreicht wurden, zeigte keinen Parasitenbefall und keine Zeichen klinischer Symptome. Die übrigen 9 Mäuse verendeten nach hoher Parasitämie 11-25 Tage p.i. (Tab. 8).

Tab. 8: Untersuchungen zur Immunisierung mit lyophilisierten T. evansi

Zahl der Mäuse	BPL- Konz. (%)	Einwirkungs- zeit von BPL (Min.)	Antigen- dosis (ml)	Antigen- konz. ⁺ (%)	Belastungs- infektion (Parasiten/Maus)	Para- sitämie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.	Überlebenszeit d. Kontroll- mäuse (Tage)
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	10-16
10	0,6	10	0,5	4	2.000	+	1	24	9-11
10	0,6	10	0,5	4	20.000	-	-	-	8-10
10	0,6	10	0,5	4	200.000	+	4	10-37	5-7
10	0,6	10	0,5	4	2.000.000	+	9	11-25	5-6

⁺jeweils 0,1 ml Parasiten in 2,4 ml BPL-PSG-Lösung

d. Dauer der Immunität

In diesem Versuch sollte an 160 Mäusen die Dauer ihres Immunschutzes geprüft werden. Hierzu wurden isolierte, lebende, vermehrungsunfähige Parasiten (0,1 ml) 10 Min. einer 0,6%igen BPL-PSG-Lösung (2,4 ml) bei 0°C ausgesetzt und danach den Versuchstieren in der einmaligen Dosierung von 0,5 ml/Maus i.p. verabreicht. Bei keinem Tier entwickelte sich bis zur Belastungsinfektion eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie.

Zur Prüfung der Immunitätsdauer sollten jeweils 10 Mäuse nach 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 Wochen mit 20 bzw. 200 Parasiten/Maus belastet werden. Die Beobachtungszeit betrug 6 Wochen p.i..

Das Blut der Mäuse wurde in der ersten Woche p.i. zweimal, danach einmal wöchentlich im W00-Test untersucht. Bei den Kontrollversuchen erhielten jeweils 5 Mäuse die gleiche Anzahl von Trypanosomen in BSG-Puffer ohne BPL. Die Versuchstiere verendeten nach 8-20 Tagen.

Nach einer 6, 12, 14, 16 und 20 Wochen später durchgeführten Belastungsinfektion zeigte keine Maus eine Parasitämie oder Krankheitssymptome. 98 der 100 Versuchstiere überlebten bis zum Abschluß der Beobachtungszeit. Zwei Mäuse, die nach 16 Wochen belastet werden sollten, verendeten interkurrent nach der Vakzinierung.

Nach einer 8 und 10 Wochen später durchgeführten Belastungsinfektion zeigte sich folgendes Resultat: Jeweils eine von 10 Mäusen, die mit 200 Parasiten belastet wurden, verendete nach hoher Parasitämie am 11. und 12. Tag p.i.. Eine Maus, die p.i. parasitenfrei blieb, mußte wegen eines Bauchhöhlentumors getötet werden. Die restlichen 37 Versuchstiere überlebten ohne Parasitenbefall und Zeichen klinischer Symptome.

Eine Maus, die nach 18 Wochen mit 20 Trypanosomen belastet wurde, verendete nach ansteigender Parasitämie am 17. Tag p.i.. Aus derselben Gruppe mußte eine Maus wegen starker Abmagerung und Schwäche getötet werden. Die übrigen Mäuse überlebten symptom- und parasitenfrei (Tab. 9).

Tab. 9: Prüfung der Immunitätsdauer

Zahl der Mäuse	βPL-Konz. (%)	Einwirkungszeit von βPL (Min.)	Antigenkonz. (%)	Antigenkonz. + Parasiten/ Maus	Belastungsinfektion p.i. Wochen	Parasit-ämie	Anzahl der toten Mäuse	Tod Tage p.i.	Oberlebenszeit der Kontrollmäuse (Tage)
10	0,6	10	0,5	4	20	-	-	-	12-20
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	9-14
10	0,6	10	0,5	4	20	-	1 ⁺⁺	-	10-16
10	0,6	10	0,5	4	200	+	1	12	9-13
10	0,6	10	0,5	4	20	-	-	-	8-17
10	0,6	10	0,5	4	200	+	1	11	8-12
10	0,6	10	0,5	4	20	-	-	-	11-18
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	10-12
10	0,6	10	0,5	4	20	-	-	-	9-15
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	8-10
10	0,6	10	0,5	4	20	-	2 ⁺⁺	-	12-13
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	9-11
10	0,6	10	0,5	4	20	+	1 ⁺⁺	17	10-17
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	8-13
10	0,6	10	0,5	4	20	-	-	-	12-14
10	0,6	10	0,5	4	200	-	-	-	8-15

⁺ jeweils 0,1 ml Parasiten und 2,4 ml βPL-PSG-Lösung

⁺⁺ Mäuse verwendeten interkurrent bzw. mußten getötet werden

IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Immunisierungsversuche mit isolierten, lebenden, abgetöteten und lyophilisierten Trypanosomen gegen die *T. evansi*-Infektion am Modell der Maus durchzuführen. Zur Abtötung der Parasiten wurde auf physikalische Methoden, wie Hitzeeinwirkung und hypotonische Zerstörung der Zelle (SOLTYS, 1967; RYU, 1975) sowie auf Verwendung von Formalin und Phenol (SOLTYS, 1965, 1967; RYU, 1975; AWAD et al., 1980) verzichtet, da durch diese die immunisierende Wirksamkeit der Trypanosomen teilweise oder vollständig zerstört werden kann.

In meinen Versuchen wurde zur Abtötung der Trypanosomen bzw. zur Beeinflussung ihrer Infektiosität β -Propiolacton verwendet, eine Verbindung, die die Antigenstruktur der Organismen wenig schädigt (LOGRIPPO und HARTMANN, 1955; SOLTYS, 1965, 1967; NEAL und JOHNSON, 1977; HERTKORN, 1981). Der schonende Einfluß von β -Propiolacton auf die Morphologie der Parasiten zeigte sich in meinen Untersuchungen darin, daß nach seiner Verwendung bei der Mehrzahl der Trypanosomen lichtmikroskopisch keine Strukturveränderungen beobachtet wurden.

Da das für die Immunisierungsversuche verwendete β -Propiolacton aus technischen Gründen nicht aus dem Antigen entfernt werden konnte, war zu prüfen, ob die Verbindung nach ihrer Verabreichung an Mäuse zu toxischen Nebeneffekten führt. Es mußte deshalb eine Toxizitätsprüfung vorgenommen werden, wobei β -Propiolacton in 0,001-2,5%igen Konzentrationen verabreicht wurde. Die zusammen mit dem Antigen übertragenen β -Propiolacton-Mengen lagen dabei im Bereich zwischen 0,000002 und 0,0125 ml/Maus.

Die Prüfung ergab, daß bei 1,5-2,5%igen Konzentrationen in den Dosierungen von 0,0075-0,0125 ml β -Propiolacton/Maus alle Versuchstiere verendeten. Bei der 1%igen Konzentration in der Dosierung von 0,005 ml wurden toxische Erscheinungen beobachtet, die bei ca. 20% der Mäuse zum Tode führten. In darunter liegenden Dosierungen waren keine toxischen Nebenwirkungen erkennbar. Die Toxizitätsprüfung ergab damit, daß die in den Versuchen verwendeten Höchstmengen von 0,002 und 0,003 ml β -Propiolacton weit unter der Dosierung lagen, die toxische Nebeneffekte bewirkte. Somit konnte der im Antigen vorhandene β -Propiolacton-Gehalt bei meinen Versuchen praktisch vernachlässigt werden.

Aus den anfangs erwähnten Gründen sollten die Parasiten zur Antigenherstellung mit β -Propiolacton abgetötet werden. Es war deshalb in einem weiteren Versuch zu klären, wie lange *T. evansi* in unterschiedlichen Konzentrationen der β -Propiolacton-Puffer-Lösungen lebensfähig ist. Zu diesem Zweck wurde β -Propiolacton in 0,1-1%igen Konzentrationen verwendet, wobei die Parasiten als abgetötet galten, sobald keine Bewegungsaktivität mehr nachweisbar war.

Das Resultat der Untersuchung zeigte, daß die Trypanosomen in einer 1%igen β -Propiolacton-Konzentration nach 60 Min. und in einer 0,1%igen Konzentration nach 300 Min. nicht mehr bewegungsaktiv waren. Zur Abtötung der Parasiten wurde die 0,6%ige β -Propiolacton-Konzentration gewählt, da die Parasiten in dieser Konzentration schon in der relativ kurzen Zeit von 90 Min. ihre Beweglichkeit verloren.

Ähnliche Untersuchungen zur Überlebenszeit von Trypanosomen in unterschiedlichen β -Propiolacton-Konzentrationen wurden von SOLTYS (1965, 1967); NEAL und JOHNSON (1977) und von HERTKORN (1981) vorgenommen. Ein direkter Vergleich der Resultate dieser Arbeitsgruppen mit meinen ist nicht möglich, da diese ihre Untersuchungen mit anderen Trypanosomenarten, Temperaturen und Puffersystemen durchführten.

In weiteren Versuchen wurde geprüft, bei welcher Konzentration der Einfluß von β -Propiolacton zum Verlust der Infektiosität bzw. zu einer Abschwächung der Virulenz von *T. evansi* führt. Diese Versuche waren deshalb wichtig, weil Immunisierungsversuche nicht nur mit abgetöteten, sondern auch mit lebenden, vermehrungsunfähigen Trypanosomen durchgeführt werden sollten.

Aus Versuchen von JAMES (1976); HUNGERER et al. (1976); MELZER (1980); GÜBEL und DENNIG (1981) und HERTKORN (1981) ist bekannt, daß durch trypanozide Substanzen, wie Berenil^R, Samorin^R und Ethidiumbromid in entsprechender Konzentration die Infektiosität lebender Trypanosomen beeinflußt werden kann. Es war deshalb zu prüfen, ob dies auch für β -Propiolacton zutrifft. In entsprechenden Versuchen wurden isolierte, lebende Trypanosomen unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz bei variabler Einwirkungszeit ausgesetzt, danach wurde die Infektiosität durch Übertragung auf Mäuse geprüft.

Das Ergebnis des Versuchs zeigte, daß die Einwirkung von β -Propiolacton in den geringen Konzentrationen von 0,0125-0,15% nach 2 bzw. 5 Min. zu keinem Infektiositätsverlust der Trypanosomen führte, da in allen Fällen eine Parasitenvermehrung auftrat. Offensichtlich fand jedoch eine Virulenzabschwächung statt, die sich in einer Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse von 6-20 Tagen ausdrückte und sich verstärkte, je höher die β -Propiolacton-Konzentration bzw. je länger die Einwirkungszeit war.

Bei einer Erhöhung der Konzentration von 0,15-0,2% trat eine Grenzsituation ein. Während die Mehrzahl der Mäuse nach protrahiertem Krankheitsverlauf und starker Parasitämie verendete, blieben die übrigen Versuchstiere frei von Parasiten und überlebten ohne Zeichen klinischer Symptome. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Parasiten gegenüber β -Propiolacton könnte darauf zurückzuführen sein, daß einzelne Trypanosomen eine höhere individuelle Resistenz gegenüber der Verbindung aufweisen und dadurch in ihrer Infektiosität weniger beeinflußt werden als andere Trypanosomen, die aufgrund einer geringeren Resistenz stärker geschädigt werden. Darüberhinaus dürfte auch die individuelle Widerstandsfähigkeit einzelner Mäuse eine Rolle spielen, da Versuche von MELZER (1980) gezeigt haben, daß experimentell abgeschwächte Trypanosomen bei NMRI-Mäusen gleicher Herkunft zu einem unterschiedlichen Infektionsverlauf führten, was die Verfasserin auf eine unterschiedlich hohe individuelle Resistenz zurückführte.

Bei einer Erhöhung der β -Propiolacton-Konzentration über 0,2% verendete kein Versuchstier. Hierbei stellte sich die Frage, ob bei den Parasiten unter Beibehaltung ihrer Vermehrungsfähigkeit eine Virulenzabschwächung oder ein vollständiger Verlust der Infektiosität aufgetreten war. Da sich im Verlauf dieses Versuches bei keiner Maus eine Parasitämie entwickelt hatte, obwohl die Trypanosomen zum Zeitpunkt der Übertragung eine hohe Bewegungsaktivität zeigten, ist anzunehmen, daß die Exposition in höheren β -Propiolacton-Konzentrationen einen kompletten Infektiositäts- und Pathogenitätsverlust bewirkte. Die endgültige Klärung der Frage, ob die Versuchstiere tatsächlich frei von Parasiten waren, wodurch der Infektiositätsverlust von *T. evansi* bewiesen wäre, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da bislang eine verlässliche Methodik zum Nachweis vereinzelter Parasiten im Wirtsorganismus fehlt. JAMES (1976) wies allerdings nach, daß Trypanosomen, die in vitro mit trypanoziden Substanzen behandelt und im bewegungsaktiven Zustand auf

Mäuse übertragen wurden, eine gewisse Zeit im Versuchstier noch nachgewiesen werden konnten, obwohl sie ihre Vermehrungsfähigkeit offensichtlich eingebüßt hatten.

Die Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen die *T. evansi*-Infektion wurden mit β -Propiolacton-behandelten lebenden, abgetöteten und lyophilisierten Trypanosomen durchgeführt. Dabei sollte die immunisierende Wirkung der drei Antigen-Gruppen getestet und miteinander verglichen werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob eine hohe Dosierung bzw. eine mehrmalige Verabreichung des Antigens eine höhere Immunisierung bewirken als geringe Antigen-Mengen.

Als Antigen wurden stets isolierte Trypanosomen verwendet, um Blutbestandteile, die eventuell die Immunisierung beeinträchtigt hätten, auszuschalten. Bei einmaliger Immunisierung mit lebenden, abgetöteten und lyophilisierten Parasiten (Dosierung: 120.000.000 Trypanosomen/Maus = 0,5 ml einer 4%igen Antigen-Suspension) zeigte sich, daß bei einer 6 Wochen später durchgeführten Belastungsinfektion der Mäuse mit 200, 2.000 und 20.000 Trypanosomen die immunisierten Tiere einen 99-100%igen Schutz aufwiesen. Bei stärkerer Belastung mit 200.000 und 2.000.000 Parasiten/Versuchstier waren 90% bzw. 60% der Mäuse, die mit lebenden Trypanosomen immunisiert waren, geschützt. Im Vergleich hierzu überlebten 60% bzw. 10% der Mäuse, die lyophilisiertes und 30% bzw. 10% der Mäuse, die abgetötetes Antigen erhielten.

Bei Mäusen, die trotz Immunisierung eine *T. evansi*-Infektion entwickelten, wurde ein verzögertes Krankheitsgeschehen mit bis zu 37 Tagen verlängerter Überlebenszeit beobachtet. Offensichtlich hatten diese Tiere eine gewisse Immunität entwickelt, die jedoch nicht ausreichend belastungsfähig war. Die Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß Versuchstiere, die mit den drei verschiedenen Antigen-Gruppen immunisiert wurden, bei der Belastung mit bis zu 20.000 Trypanosomen eine weitgehend gleich hohe Schutzwirkung aufwiesen. Nach hohen Belastungsinfektionen mit 200.000 und 2.000.000 Trypanosomen zeigte sich dagegen, daß die mit Lebendantigen behandelten Tiere einen wesentlich höheren Immunisierungsgrad entwickelt hatten als Mäuse, denen lyophilisiertes oder abgetötetes Antigen verabreicht wurde. Dabei scheint Antigen aus lyophilisierten Trypanosomen dem aus abgetöteten überlegen zu sein.

Eine Erklärung für die besser immunisierende Wirkung von Lebendantigen wäre unter Umständen darin zu suchen, daß lebende Parasiten nach der Übertragung auf die Versuchstiere noch Stoffwechselantigene ausscheiden können, die zur verstärkten Antikörperbildung anregen und damit eine intensivere Immunantwort hervorrufen würden. Diese Vermutung wurde bei ähnlichen Versuchen auch von JAMES (1976) ausgesprochen.

Offensichtlich bewirkt auch die Verabreichung von Lebendantigen einen höheren Antikörpertiterspiegel als Totantigen. Dies wies HERTKORN (1981) nach, die zeigte, daß der Antikörpertiter nach Verabreichung von virulenzgeschwächten, lebenden *T. evansi* deutlich höher ist als bei Totantigen.

Die schwächere Wirksamkeit abgetöteter Parasiten kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, daß die Antigenstruktur der Parasiten während ihrer längeren Expositionszeit beim Abtötungsprozess durch β -Propiolacton stärker geschädigt wird, als dies bei den übrigen Antigen-Gruppen der Fall ist.

Die Ergebnisse meines Versuchs mit lebenden Parasiten stimmen im übrigen weitgehend mit denen einer Reihe anderer Autoren überein. DUXBURY et al. (1974) erhielten bessere Resultate bei der Immunisierung mit Stoffwechselantigenen von lebenden Trypanosomen als mit lyophilisierten Parasiten und HUNGERER et al. (1976); JAMES (1976) und HERTKORN (1981) erzielten ebenfalls eine gute Immunisierung mit lebenden vermehrungsunfähigen bzw. virulenzgeschwächten Trypanosomen.

Was die Immunisierung mit abgetöteten oder lyophilisierten Parasiten betrifft, so liegt eine Reihe von Versuchsergebnissen vor, die ebenfalls mit meinen vergleichbar sind. So führte SOLTYS (1965, 1967) Untersuchungen zur Immunisierung mit β -Propiolacton-abgetöteten Trypanosomen mit gutem Erfolg durch, ebenso NEAL und JOHNSON (1977) und HERTKORN (1981). DUXBURY et al. (1974) und NEAL und JOHNSON (1977) erzielten im Gegensatz zu GILL (1965) und AWAD et al. (1980) gute Ergebnisse bei der Immunisierung mit lyophilisierten Parasiten.

Ein direkter Vergleich der Resultate dieser Arbeitsgruppen mit meinen Ergebnissen ist jedoch nicht möglich, da die Untersuchungen unter verschiedenen Voraussetzungen hinsichtlich Trypanosomenarten, Antigen-Dosierung, Belastungshöhe, Zeitabstand zwischen Immunisierung und Belastungsinfektion sowie Anzahl der Immunisierung durchgeführt wurden. Vor allem fehlt dadurch die Möglichkeit, vergleichend den Immunisierungsgrad zu beurteilen, da insbesondere für die Belastungsinfektionen sich stark unterscheidende Inokula verwendet wurden.

Bei der einmaligen Immunisierung mit abgetöteten Parasiten (Dosierung: 25.000.000, 50.000.000, 120.000.000 und 240.000.000 Trypanosomen/Maus = 0,5 ml einer 1, 2, 4 und 8%igen Antigen-Suspension) sollte untersucht werden, ob eine hohe Dosierung des Antigens eine bessere Immunisierung bewirkt als geringe Antigen-Mengen. Es zeigte sich, daß bis zur Belastungsinfektion mit 20.000 Parasiten/Maus 100% der Versuchstiere überlebten, gleichgültig, ob sie mit 1, 2, 4 oder 8%iger Antigen-Konzentration immunisiert waren. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß durch die verschiedenen Antigen-Konzentrationen ein Immunitätsgrad erreicht wird, der unabhängig von der jeweiligen Antigen-Konzentration genügend hoch ist, um eine Belastung von 20.000 Parasiten zu neutralisieren. Bei einer höheren Belastungsinfektion mit 200.000 verendeten entsprechend der jeweiligen Konzentration 50-80%, mit 2.000.000 Trypanosomen 80-100% der Mäuse, wobei die höheren Antigen-Konzentrationen keine oder eine nur unwesentliche Verstärkung der Schutzwirkung erzielten. Als Erklärung wäre anzuführen, daß auch ein hoher Immunschutz, der durch eine erhöhte Antigen-Dosierung bewirkt wurde, bei einer sehr massiven Belastungsinfektion zusammenbrechen kann.

Im Rahmen der Untersuchungen mit Totantigen sollte weiterhin geprüft werden, ob die zweimalige Verabreichung 1, 2, 4 und 8%iger Antigen-Konzentrationen (Dosierung: zweimal 25.000.000, 50.000.000, 120.000.000, 240.000.000 Trypanosomen/Maus = zweimal 0,5 ml einer 1, 2, 4 und 8%igen Antigen-Suspension) eine stärkere Immunisierung bewirkt als die einmalige Verabreichung. Das Resultat der Untersuchungen zeigte, daß eine mehrmalige Immunisierung keine bessere Schutzwirkung erzielte als eine einmalige Immunisierung. Nach zweimaliger Verabreichung des Antigens verendeten in den verschiedenen Konzen-

trations- und Belastungsgruppen bis zu 12,5% mehr Mäuse als nach einmaliger Immunisierung. Ähnliche Beobachtungen machte JAMES (1976) bei der Immunisierung mit lebenden, Berenil-behandelten Trypanosomen. Auch hier wiesen die Mäuse nach zwei- bis dreimaliger Vakzinierung eine geringere Schutzwirkung als nach einmaliger Vakzinierung auf.

Diese Ergebnisse stehen allerdings in Widerspruch zu denen von DUXBURY und SADUN (1969) und RYU (1975). Nach mehrmaliger Verabreichung von lebenden, gamma-bestrahlten und abgetöteten Trypanosomen trat bei den Versuchstieren ein 80-100%iger Schutz gegenüber der Belastungsinfektion auf, während bei einmaliger Verabreichung des Antigens 70-90% der Mäuse geschützt waren.

Im Verlauf der eigenen Untersuchungen zur zweimaligen Immunisierung mit abgetöteten Trypanosomen entwickelten 3 Mäuse am 15. und 22. Tag nach der Belastungsinfektion eine geringgradige Parasitämie, die jeweils nur an einem Tag nachgewiesen wurde. Die Versuchstiere überlebten symptomfrei. Offensichtlich war bei diesen 3 Mäusen die Immunität weniger stark ausgebildet als bei den übrigen Versuchstieren, bei denen sich keine Trypanosomen vermehren konnten. Trotzdem reichte die Schutzwirkung aus, die Parasiten zu eliminieren und damit einen klinischen Rückfall zu verhindern.

Zur Prüfung der Dauer des Immunschutzes wurden Mäuse mit lebenden, β -Propionlacton inkubierten Trypanosomen immunisiert. Bei den bis zu 5 Monaten nach der Immunisierung durchgeführten Belastungsinfektionen mit 20 bzw. 200 Trypanosomen/Maus zeigte sich, daß ca. 99% der Versuchstiere eine genügend hohe Immunität aufbauten, die verhinderte, daß es weder zur Parasitenvermehrung noch zu klinischen Durchbrüchen kam.

Bei 3 von 160 Mäusen entwickelte sich eine tödlich verlaufende Infektion, die sich nicht vom Infektionsverlauf der Kontrollmäuse unterschied. Dieses Verhalten könnte damit erklärt werden, daß es sich um Versuchstiere handelte, die nicht in der Lage waren, eine Immunität aufzubauen oder aber, daß eine technische Fehlerquelle bei der Immunisierung vorlag.

Die Ergebnisse dieses Versuchs stimmen weitgehend mit denen von JAMES (1976); SOLTYS (1967) und HERTKORN (1981) überein, die einen 5, 6 und 9 Wochen anhaltenden Immunschutz bei Mäusen nachwiesen. Versuche von LOURIE und O'CONNOR (1936) und FULTON und LOURIE (1945) zeigten, daß infizierte und anschließend

behandelte Mäuse sogar bis zu 32 Wochen gegen eine Belastungsinfektion mit Trypanosomen der gleichen Erregerspezies immun waren. WELLDÉ et al. (1973) wiesen eine Immunität bei Rindern nach, die durchschnittlich 8 Monate, in einzelnen Fällen bis zu 14 Monate dauerte. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Autoren mit meinen ist allerdings nicht möglich, da die Untersuchungen nach unterschiedlichen Immunisierungsverfahren und unter verschiedenen Voraussetzungen hinsichtlich Trypanosomenspezies, Tierart, Antigen-Dosierung und Belastungshöhe durchgeführt wurden.

Meine Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Mäusen mit β -Propiolacton-behandelten *T. evansi* ein hoher Immunschutz aufgebaut werden kann. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit lebenden, vermehrungsunfähigen Parasiten erzielt, eine wirksame Immunisierung gelang aber auch mit abgetöteten und lyophilisierten Parasiten.

V. Zusammenfassung

Die Arbeit befaßt sich mit Versuchen zur Immunisierung von Mäusen gegen eine *Trypanosoma evansi*-Infektion mit β -Propiolacton-behandelten lebenden, abgetöteten und lyophilisierten Trypanosomen.

Mit allen drei Antigen-Gruppen wurde 6 Wochen nach der Immunisierung ein Immunschutz erreicht, der annähernd 100% der Versuchstiere gegen eine Belastungsinfektion mit bis zu 20.000 Parasiten/Maus schützte. Bei Verwendung von lebenden, vermehrungsunfähigen Trypanosomen waren 60-90% der Mäuse gegen eine höhere Belastung mit 200.000 und 2.000.000 Parasiten/Versuchstier geschützt, während bei Verabreichung von abgetötetem und lyophilisiertem Antigen bei gleicher Belastung nur 10-60% der Mäuse überlebten.

Eine belastbare Immunität wurde bis zu 5 Monate nach der Immunisierung mit Lebendantigen festgestellt. Hohe Antigen-Dosierungen bzw. mehrmalige Immunisierungen bewirkten keine bessere Schutzwirkung als die Verwendung geringer Antigen-Mengen.

β -Propiolacton erwies sich bei der Antigen-Herstellung als eine zellschonende Verbindung, die für Mäuse in den verwendeten Dosierungen von 0,002 und 0,003 ml/Versuchstier nicht toxisch war.

Die Überlebensfähigkeit von *Trypanosoma evansi* wurde in vitro bei 0,1-1%igen β -Propiolacton-PSG-Lösungen geprüft und betrug entsprechend der jeweiligen Konzentration 60-300 Minuten.

Die Infektiosität von *Trypanosoma evansi* wurde nach einer Expositionszeit von 2-210 Minuten in unterschiedlichen β -Propiolacton-Konzentrationen untersucht. Nach Einwirkungszeiten von 2 bzw. 5 Minuten in 0,0125-0,15%igen β -Propiolacton-PSG-Lösungen blieb die Infektiosität erhalten. Längere Expositionszeiten und höhere β -Propiolacton-Konzentrationen bewirkten einen vollständigen Verlust der Infektiosität.

Stolte, Ch.: Experiments on the immunization of mice against
Trypanosoma evansi (strain Manila)

Summary

Studies were carried out on the immunization of mice against *Trypanosoma evansi* using living, dead and freeze-dried trypanosomes, treated with β -Propiolactone.

All 3 types of antigen induced an immunity, which 6 weeks later protected approximately 100% of the laboratory animals against challenge infections running up to 20.000 parasites/mouse. 60-90% of the mice, that received living trypanosomes which were unable to multiply resisted a higher challenge of 200.000 and 2.000.000 parasites, while only 10-60% of the laboratory animals, that were immunized with dead or freeze-dried antigen survived the same challenge.

Protective immunity was observed up to 5 months after immunization with living trypanosomes. A higher degree of immunity was not obtained by increasing nor by multiplying the inoculating dose.

β -Propiolactone, the drug used for the antigen-preparation, was found to preserve *Trypanosoma evansi* and to be non-toxic when administered in amounts of 0.002 and 0.003 ml per mouse.

Trypanosoma evansi, exposed in vitro to 0.1-1% β -Propiolactone-PSG-solutions survived 60-300 minutes according to the concentration used.

The infectivity of *Trypanosoma evansi* was tested after the parasites were exposed for 2-210 minutes to different β -Propiolactone concentrations. The infectivity was not destroyed after a 2-5 minute treatment in 0.0125-0.15% β -Propiolactone-PSG-solutions. However higher β -Propiolactone concentrations and longer drug-treatments led to a complete loss of infectivity.

VI. Literaturverzeichnis

- Awad, F.I., Y.Z. El Abdin, A.M. Bolos, A.A. Fayed, S.M. Salch (1980): Protection of mice by single inoculation with *Trypanosoma evansi* products. Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, 1-11
- Bevan, U.E.W. (1928): A method of inoculating cattle against trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 22, 147-156
- Bevan, U.E.W. (1936): Notes on immunity in trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 30, 199-206
- Clarkson, M.J. (1976): Trypanosomas. Vet. Parasit. 2, 9-29
- Duxbury, R.E., E.H. Sadun (1969): Resistance produced in mice and rats by inoculation with irradiated *Trypanosoma rhodesiense*. J. Parasit. 55, 859-865
- Duxbury, R.E., E.H. Sadun, J.S. Anderson (1972): Experimental infections with African trypanosomas. II. Immunization of mice and monkeys with a gamma-irradiated, recently isolated human strain of *Trypanosoma rhodesiense*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21, 885-888
- Duxbury, R.E., J.S. Anderson, B.T. Wellde, E.H. Sadun, I.E. Muriithi (1972): *Trypanosoma congolense*: Immunization of mice, dogs and cattle with gamma-irradiated parasites. Exper. Parasit. 32, 527-533
- Duxbury, R.E., E.H. Sadun, M.J. Schoenbechler, D.A. Stroupe (1974): *Trypanosoma rhodesiense*: protection in mice by inoculations of homologous parasite products. Exper. Parasit. 36, 70-76
- Ehrlich, P., K. Shiga (1904): Farbtherapeutische Versuche bei Trypanosomen-erkrankung. Berl. Klin. Wschr. xli, 329, 369
- Fulton, J.D., E.M. Lourie (1945): The immunity of mice cured of trypanosome infections. Ann. Trop. Med. Parasit. 40, 1-9
- Gill, B.S. (1965): Studies on protective immunity of *Trypanosoma evansi*. J. Comp. Path. 75, 233-240
- Göbel, E., H.K. Dennig (1981): *Trypanosoma evansi*: Mikromorphologisches und biologisches Verhalten vor und nach Berenil-Exposition. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 241-246
- Hertkorn, U. (1981): Untersuchungen zur Immunisierung gegen die *Trypanosoma evansi*-Infektion bei der Maus. Vet. med. Diss., München

- Holmes, P.H. (1980): Vaccination against Trypanosomes. Vaccines against parasites. Brit. Soc. Parasit. Symposia 18, 75-105
- Hungerer, K.D., B. Enders, O. Weisler (1976): On the immunology of infection with *Trypanosoma cruzi*. 2. The preparation of an apathogenic living vaccine. Behring Inst. Mitt. 60, 84-97
- James, D.M., A.D. Fregene, K. Salomon (1973): The effect of irradiation on infectivity and immunogenicity of *Trypanosoma brucei*. J. Parasit. 59, 489-492
- James, D.M. (1976): Introduction of immunity in rodents receiving living drug-treated trypanosomes. Int. J. Parasit. 6, 179-182
- Lanham, S.M. (1968): Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. Nature 218, 1273-1274
- Lanham, S.M., D.G. Godfrey (1970): Isolation of salvarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-Cellulose. Exper. Parasit. 28, 521-534
- Logrippe, G.A., F.W. Hartmann (1955): Antigenicity of beta-propiolactone inactivated virus vaccines. J. Immunol. 75, 123-128
- Lourie, E.M., R. J. O'Connor (1936): Trypanolysis in vitro by mouse immune serum. Ann. Trop. Med. and Parasit. 30, 365
- Mahmoud, M.M., A.R. Gray (1980): Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* {Steel 1885} Balbiani, 1888. A review of recent research. Trop. Anim. Hlth. Prod. 12, 35-47
- Melzer, I. (1980): Untersuchungen zum Einfluß von Berenil^R auf die Variantenbildung bei *Trypanosoma evansi* (Stamm Bali) in der Maus. Vet. med. Diss., München
- Mühlpfordt, H. (1964): Die Generationsdauer verschiedener Trypanosomenarten. Ztschr. Tropenmed. Parasit. 15, 145-153
- Murray, M., G.M. Urquhart (1977): Immunoprophylaxis against African trypanosomiasis. In: L.H. Miller, J.J. McKelvey, Jr. (eds.) Advances in Experimental Medicine and Biology 93, 209-241, Plenum Press New York and London
- Neal, R.A., P. Johnson (1977): Immunization against *Trypanosoma cruzi* using killed antigens with saponin as adjuvant. Acta Tropica 34, 87-96
- Nöller, H.G. (1955): Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus. Klin. Wschr. 33, 770-771
- Ryu, E. (1975): The efficacy of killed *Trypanosoma evansi* vaccines in mice. Chin. J. Microbiol. 8, 280-285
- Ryu, E., K.C. Shaey (1980): Protective effect of zeolite absorbed *Trypanosoma gambiense* inactive vaccines on mice. Int. J. Zoon. 7, 101-106

- Soltys, M.A., I.M. Smith (1963): Studies of protective antibodies in trypanosomiasis in diseased and vaccinated animals. Proc. 17th Internat. Vet. Congr. Hannover
- Soltys, M.A. (1965): Immunogenic properties of *Trypanosoma brucei* inactivated by beta-propiolactone. Progress in Protozoology, Series No. 91, 138-139. 2nd International Conference on Protoz.; Abstracts of paper, Amsterdam, Experta Medica Foundation
- Soltys, M.A. (1967): Comparative studies of immunogenic properties of *Trypanosoma brucei* inactivated with beta-propiolactone and with some other inactivating agents. Can. J. Microbiol. 13, 743-747
- Soltys, M.A. (1973): A review of studies on immunization against protozoan diseases of animals. Z. Tropenmed. Parasit. 24, 309-322
- Taylor, A.E.R., S.M. Lanham, J.E. Williams (1974): Influence of methods of preparation on the infectivity, agglutination, activity and ultrastructure of bloodstream trypanosomes. Exper. Parasit. 35, 196-208
- Terry, B.T. (1911): Chemo-therapeutic trypanosome studies with special reference to the immunity following cure. Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research. Number 3
- Terry, B.T. (1976): Immunity to African trypanosomiasis. In: Immunology of parasitic infections. S. Cohen, E. Sadun (eds.) 203-221. Blackwell Scientific Publications Oxford
- Wellde, B.T., R.E. Duxburry, E.H. Sadun, H.R. Langbehn, R. Lötsch, G. Reindl, G. Warni (1973): Experimental infections with African trypanosomes. IV. Immunization of cattle with gamma-irradiated *Trypanosoma rhodesiense*. Exper. Parasit. 34, 62-68
- Woo, P.T.K. (1969): The haematokrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. Can. J. Zool. 47, 921-923.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. K. Dennig für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit danken.

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name: Christine Linda Stolte geb. Bremer
Geburtsdatum: 12. Januar 1951
Geburtsort: 8900 Augsburg
Eltern: James Harold Bremer, Offizier
Elisabeth Bremer, geb. Kastner

2. Schulbildung, Studium und Berufspraxis:

1957: Eintritt in die Volksschule in Fort Campell,
Kentucky, USA
1958: Obertritt in die Volksschule in Fort Benning,
Georgia, USA
1959: Obertritt in die Volksschule in Fayetteville,
North Carolina, USA
1959: Obertritt in die Volksschule in Columbus,
Georgia, USA
1960: Obertritt in die Volksschule in Fort Benning,
Georgia, USA
1963: Eintritt in die "Deutsche Oberschule Paris"
in Paris, Frankreich
1966: Obertritt in das "A.B. von Stettensches Institut",
Gymnasium in Augsburg
1971: Zeugnis der Reife
1971: Beginn des Studiums für Angewandte Sprachwissen-
schaften an der Universität Heidelberg
1974: Beginn des Studiums der Tiermedizin an der
Justus-Liebig-Universität in Gießen
1976: Obertritt an die Ludwig-Maximilians-Universität
in München
1979: Abschluß der Tierärztlichen Prüfung
1980: Erwerb der Erlaubnis zur vorübergehenden Ausübung
des tierärztlichen Berufes
1980: Aufnahme der Tätigkeit als Assistentin in einer
Kleintierpraxis
1981: Beginn der Dissertationsarbeit am Institut für
Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
1982: Approbation als Tierärztin

